

**BỘ Y TẾ  
BỆNH VIỆN BẠCH MAI**

**XÉT NGHIỆM  
VI SINH LÂM SÀNG  
(SÁCH PHỤC VỤ ĐÀO TẠO LIÊN TỤC)**



**Hà Nội - 2012**

## MỤC LỤC

### Chương I: Đại cương về vi sinh vật

Bài 1. Khái niệm về vi sinh vật. Vai trò của phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng	1 <i>Đoàn Mai Phương</i>
Bài 2. Hình thê, cấu trúc và sinh lý của vi khuẩn. Các vi khuẩn gây bệnh thường gặp	8
Bài 3. Đại cương về virus	14
	<i>Vũ Thị Tường Vân, Lê Thị Oanh</i>
Bài 4. Một số phản ứng kháng nguyên – kháng thể sử dụng trong chẩn đoán vi sinh y học	23 <i>Vũ Thị Tường Vân</i>
Bài 5. Phương pháp lấy, vận chuyển và bảo quản bệnh phẩm để xét nghiệm vi sinh	32 <i>Đoàn Mai Phương</i>

### Chương II: Các kỹ thuật xét nghiệm cơ bản

Bài 6. Các phương pháp khử trùng, tiệt trùng trong phòng xét nghiệm	41 <i>Đoàn Mai Phương, Nguyễn Thị Hạnh</i>
Bài 7. Hướng dẫn sử dụng và bảo quản kính hiển vi quang học	46 <i>Trần Minh Tuấn</i>
Bài 8. Sử dụng, bảo quản một số máy móc trang thiết bị phòng xét nghiệm	52 <i>Lê Trung Dũng</i>
Bài 9. Thao tác vô trùng	61 <i>Mai Thị Lan Hương</i>

### Chương III: Các kỹ thuật xét nghiệm vi khuẩn

Bài 10. Nhuộm Gram	67 <i>Đoàn Mai Phương, Nguyễn Sâm</i>
Bài 11. Xét nghiệm AFB đờm bằng kỹ thuật nhuộm Ziehl – Neelsen.	71 <i>Đoàn Mai Phương, Phạm Bích Liên</i>
Bài 12. Xét nghiệm cáy máu tìm vi khuẩn gây bệnh	77 <i>Đoàn Mai Phương, Mai Thị Lan Hương</i>

Bài 13. Xét nghiệm cây phân tìm vi khuẩn gây bệnh	81
<i>Đoàn Mai Phương, Phùng Thị Thường</i>	
Bài 14. Xét nghiệm cây mủ tìm vi khuẩn gây bệnh	86
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 15. Xét nghiệm cây đờm tìm vi khuẩn gây bệnh	88
<i>Đoàn Mai Phương, Đặng Thu Nga</i>	
Bài 16. Xét nghiệm cây dịch ty hầu tìm vi khuẩn gây bệnh	92
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 17. Xét nghiệm cây nước tiểu tìm vi khuẩn gây bệnh	95
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 18. Xét nghiệm cây dịch não tủy, các chất dịch tìm vi khuẩn gây bệnh	100
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 19. Xét nghiệm soi, cây dịch tiết đường sinh dục tìm vi sinh vật gây bệnh	102
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 20. Nuôi cây, phân lập, định danh <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	107
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 21. Nuôi cây, phân lập, định danh <i>Acinetobacter baumannii</i>	110
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 22. Nuôi cây, phân lập, định danh các vi khuẩn họ <i>Enterobacteriaceae</i>	112
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 23. Nuôi cây, phân lập, định danh <i>Salmonella</i>	116
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 24. Nuôi cây, phân lập, định danh <i>Shigella</i>	121
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 25. Nuôi cây, phân lập, định danh <i>Staphylococci</i>	125
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 26. Nuôi cây, phân lập, định danh <i>Streptococci</i>	128
<i>Đoàn Mai Phương</i>	
Bài 27. Kháng sinh đồ phương pháp khoanh giấy kháng sinh khuếch tán (Disk Difusion Method)	131
<i>Đoàn Mai Phương</i>	

<b>Chương IV: Các kỹ thuật xét nghiệm Virus - Miễn dịch</b>	
Bài 28. Chẩn đoán virus viêm gan B bằng các kỹ thuật huyết thanh học.	144
<i>Vũ Thị Tường Vân</i>	
Bài 29. Chẩn đoán viêm não Nhật Bản	171
<i>Trương Thái Phương, Vũ Thị Tường Vân</i>	
Bài 30. Chẩn đoán bệnh giang mai bằng các kỹ thuật huyết thanh học	177
<i>Trương Thái Phương, Vũ Thị Tường Vân</i>	
Bài 31. Chẩn đoán Dengue xuất huyết bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch	188
<i>Lê Thị Ngân, Vũ Thị Tường Vân</i>	
Bài 32. Chẩn đoán Rotavirus nhóm A bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch	196
<i>Lê Thị Ngân, Vũ Thị Tường Vân</i>	
Bài 33. Chẩn đoán thương hàn bằng phản ứng Widal	200
<i>Nguyễn Ngọc Diệp, Vũ Thị Tường Vân</i>	
Bài 34. Phát hiện Antistreptolysin O bằng kỹ thuật ngưng kết hạt Latex	205
<i>Nguyễn Thị Tuyết Mai, Vũ Thị Tường Vân</i>	
Bài 35. Chẩn đoán cúm A, B bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch	209
<i>Lê Thị Ngân, Vũ Thị Tường Vân</i>	
<b>Chương V: Các kỹ thuật xét nghiệm Ký sinh trùng</b>	
Bài 36. Xét nghiệm phân tìm ký sinh trùng đường ruột	213
<i>Trần Bá Sinh</i>	
Bài 37. Xét nghiệm máu tìm ký sinh trùng sốt rét	224
<i>Trần Bá Sinh</i>	
<b>Chương VI: Các kỹ thuật xét nghiệm Nấm</b>	
Bài 38. Xét nghiệm nấm	231
<i>Phạm Thị Thảo Hương</i>	
Bài 39. Nuôi cấy, định danh Candida	236
<i>Phạm Thị Thảo Hương</i>	
<b>Tài liệu tham khảo</b>	241
<b>Tự lượng giá</b>	244

## CÁC TỪ VIẾT TẮT

BCDN:	Bạch cầu đa nhân
HT:	Huyết thanh
KKT:	Kháng kháng thể
KST:	Ký sinh trùng
KN-KT:	Kháng nguyên – Kháng thể
VK:	Vi khuẩn
VSV:	Vi sinh vật
VR :	Virus
HĐ :	Hoạt động
ĐB:	Đột biến
VGM:	Viêm gan mạn
KHĐ:	Không hoạt động
KSTSР:	Ký sinh trùng sốt rét
SLKL:	Số lượng khuẩn lạc

# CHƯƠNG I

## ĐẠI CƯƠNG VỀ VI SINH VẬT

### Bài 1

#### KHÁI NIỆM VỀ VI SINH VẬT

#### VAI TRÒ CỦA PHÒNG XÉT NGHIỆM VI SINH LÂM SÀNG

##### Mục tiêu

1. *Trình bày được phân bố của vi sinh vật trong tự nhiên và trên cơ thể người.*
2. *Trình bày được vai trò của vi sinh vật trong tự nhiên và trên cơ thể người.*
3. *Phân biệt được cấu trúc và kích thước của vi khuẩn, virus, nấm, ký sinh trùng.*
4. *Trình bày được vai trò của phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.*

##### 1. Một số khái niệm về vi sinh vật

- Vi sinh vật là những sinh vật sống có kích thước nhỏ bé mà mắt thường không nhìn thấy được.
- Vi sinh vật học là khoa học nghiên cứu về các vi sinh vật.
- Vi sinh y học là một phân khoa của vi sinh học, chuyên nghiên cứu về các vi sinh vật có hại hoặc có lợi cho sức khỏe con người, chủ yếu là các vi sinh vật có khả năng gây bệnh.

##### 2. Phân bố của vi sinh vật

###### 2.1. Phân bố của vi sinh vật trong tự nhiên

Vì sinh vật tồn tại khắp nơi trong tự nhiên.

###### 2.1.1. Trong đất

Đất là môi trường thích hợp cho vi sinh vật, vì trong đất có các chất hữu cơ, vô cơ và nước. Tuỳ theo loại đất và độ sâu mà chất dinh dưỡng của đất khác nhau, dẫn tới số lượng và chủng loại vi sinh vật cũng khác nhau. Trong 1gam đất có thể có từ 200 triệu tới 5.000 triệu vi sinh vật. Bề mặt của đất ít ánh sáng và khô nên ít vi sinh vật. Ở độ sâu từ 10 - 20 cm có nhiều vi sinh vật nhất. Có thể có

một số vi sinh vật gây bệnh có nha bào như uốn ván, than, ngộ độc thịt và vi khuẩn hoại thư. Các vi khuẩn này có thể tồn tại trong nhiều tháng. Một số vi khuẩn không nha bào như các vi khuẩn gây bệnh đường ruột hoặc đường hô hấp nhưng chúng chỉ có thể tồn tại trong đất từ 1 - 5 tuần.

### 2.1.2. Trong nước

Vi sinh vật có thể tồn tại trong môi trường nước, chủ yếu do từ đất hoặc có thể từ không khí rơi xuống. Số lượng và chủng loại vi sinh vật phụ thuộc vào nguồn nước. Nguồn nước bẩn thường có nhiều vi sinh vật hơn nguồn nước sạch. Vi sinh vật gây bệnh có thể gặp trong nước, sống ở đường tiêu hoá của các loài động vật sống ở dưới nước, sau đó lây sang người và các loại động vật khác. Nhiều bệnh đường ruột nguy hiểm thường lây lan do nước bị nhiễm bẩn. Thời gian tồn tại của vi khuẩn trong nước có thể từ một vài ngày đến một tuần, tùy loại vi khuẩn và độ sạch bẩn của nước. *E. coli* là vi khuẩn có nhiều trong phân và thường có trong nước. Do vậy dựa vào số lượng *E. coli* ta có thể đánh giá được mức độ nước bị nhiễm bẩn.

### 2.1.3. Trong không khí

Không khí là môi trường không thuận lợi cho vi sinh vật phát triển nhưng là đường truyền bệnh nguy hiểm. Vi sinh vật trong không khí thường bài tiết từ đường hô hấp do hắt hơi, ho và nói to. Các giọt hô hấp được thả trong không khí có thể mang theo các vi sinh vật gây bệnh. Người ta có thể hít phải các vi sinh vật gây bệnh này. Cách truyền trực tiếp này làm các dịch bệnh đường hô hấp lây lan rất nhanh. Các vi sinh vật gây bệnh thường gặp trong không khí là vi khuẩn lao, bạch hầu, liên cầu, tụ cầu, phế cầu... và các virus thuộc nhóm Mycovirus.

## 2.2. Phân bố và vai trò của vi sinh vật trên cơ thể người

### 2.2.1. Một số khái niệm về cư trú của vi sinh vật

- Vi sinh vật cư trú trên cơ thể người được gọi là vi hệ bình thường (Normal, usual, indigenous flora). Vi hệ bình thường là những quần thể vi sinh vật tồn tại trên da và niêm mạc các hốc tự nhiên của cơ thể người bình thường.

- Vi sinh vật cư trú thay đổi khác nhau giữa các cơ quan trên cơ thể. Đa số các cơ quan đều có vi sinh vật cư trú, nhưng có vi sinh vật chỉ cư trú ở vị trí

nhất định. Bình thường trong máu, dịch não tuỷ và các phủ tạng không có vi khuẩn cư trú.

- Cư trú bình thường (Commensal): Một mối liên quan trong đó vi sinh vật sống trong hoặc trên vật chủ mà cả hai không có lợi hoặc không có hại.
- Cộng sinh (Symbiosis): Một mối liên quan trong đó vi sinh vật sống trên hoặc trong vật chủ và cả hai đều có lợi.
- Ký sinh (Parasite): Một mối liên quan trong đó vi sinh vật sống trên hoặc trong vật chủ và thu được lợi nhuận của vật chủ.
- Thường trú (Resident): Vi sinh vật có mặt thường xuyên hàng tháng, hàng năm tại một số cơ quan, có thể giảm số lượng khi tắm, rửa nhưng không mất hoàn toàn.
- Tạm trú (Transient): Vi sinh vật có mặt trong thời gian ngắn, không tồn tại vĩnh viễn, thường ở bề mặt da, có thể mất đi khi tắm, rửa. Ví dụ: *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *S. aureus*

### 2.2.2. Phân bố của vi sinh vật trên cơ thể

- Số lượng vi sinh vật trên cơ thể người:  $10^{14}$  vi khuẩn, trong khi đó cơ thể chỉ có  $10^{13}$  tế bào.
  - + Chủng loại: Có khoảng trên 200 loài vi sinh vật, có cả vi khuẩn khí và vi khuẩn hiếu khí. Tỷ lệ vi khuẩn hiếu khí/vi khuẩn khí.
  - + Trên da: 1/10
  - + Niêm mạc miệng, âm đạo: 1/30
  - + Đại tràng: 1/100 - 1000
- Số lượng và chủng loại VSV cư trú phụ thuộc vào:
  - + Tuổi: Trước khi sinh thai nhi sống hoàn toàn trong môi trường vô trùng. Sau khi sinh trẻ tiếp xúc với nhiều loại vi sinh vật có trong môi trường, các vi sinh vật cư trú tại vị trí thích hợp trên cơ thể. Khoảng vài tháng sau khi sinh, vi sinh vật trên trẻ em tương tự như người lớn.
  - + Giới.
  - + Chế độ ăn.
  - + Hormon.
  - + Yếu tố xã hội.

- + Sức khoẻ.
- + Vệ sinh cá nhân.
- Phân bố:
  - + Da: Có  $10^6$  vi khuẩn/cm<sup>2</sup>, gồm cầu khuẩn gây bệnh hoặc không gây bệnh, các trực khuẩn Gram dương không có độc lực, nấm men. Tắm, rửa làm giảm 90% vi sinh vật trên da nhưng nhanh chóng được bổ sung từ tuyến bã, tuyến mồ hôi, vùng da lân cận và từ môi trường sau vài giờ.
  - + Đường hô hấp trên:  
Mũi có nhiều tụ cầu vàng và trực khuẩn Gram dương.  
Họng mũi có các phé cầu, liên cầu, *Neisseria, H. influenzae*.
  - + Đường tiết niệu - Sinh dục:  
Niệu đạo ngoài có khoảng  $10^4$  vi khuẩn/ ml dịch, gồm cầu khuẩn Gram dương, trực khuẩn, vi khuẩn khí gây bệnh hoặc không gây bệnh.  
Dịch âm đạo: Nhiều *Lactobacillus* tạo pH kiềm.
  - + Đường tiêu hoá:  
Miệng: là nơi có nhiều cặn bã thức ăn thích hợp cho vi sinh vật phát triển. Miệng có số lượng lớn vi sinh vật, khoảng  $10^9$  vi khuẩn/ml nước bọt. Quản thể vi sinh vật phong phú cả hiếu khí, khí và nấm men, gồm trên 100 loại vi khuẩn như tụ cầu, liên cầu, trực khuẩn, xoắn khuẩn, vi khuẩn khí...
  - Dạ dày: *H. pylori*  
Ruột non: Ít vi sinh vật vì pH kiềm và nhiều men thuỷ phân  
Ruột già: Số lượng  $10^{10}$ - $10^{11}$  vi khuẩn/gam phân. Người trưởng thành bài tiết  $3 \times 10^{13}$  vi khuẩn/1 ngày (25%-35% trọng lượng phân là vi khuẩn). Chủng loại gồm 400 loài vi khuẩn, chủ yếu là loại khí (90-99%). Tỷ lệ vi khuẩn hiếu khí thường chỉ chiếm 1% tổng số lượng vi khuẩn. *E. coli* là vi khuẩn chiếm nhiều nhất trong các vi khuẩn hiếu khí. Ngoài ra còn có nấm men. Trẻ em có nhiều *Lactobacillus*. Người già có nhiều *E. coli, Clostridium*

### 3. Vai trò có lợi của vi sinh vật

Đa số các vi sinh vật là có lợi cho người. Chỉ có một số vi sinh vật gây bệnh.

### **3.1. Trong thiên nhiên**

Các vi sinh vật trong đất đã tham gia vào hai chu trình quyết định cho sự tồn tại của sự sống, đó là chu trình carbon và nitơ.

### **3.2. Trong công nghiệp**

Vi khuẩn mang lại những lợi ích lớn về kinh tế. Người ta đã lợi dụng những hoạt động chuyển hóa của vi khuẩn để áp dụng trong kỹ nghệ làm da, làm giấy, điều chế các kháng sinh, sản xuất bia, rượu, bánh mỳ, dấm, sữa chua, muối dưa...

### **3.3. Trong nông nghiệp**

Vi khuẩn làm tăng chất màu của đất, làm ải đất giúp cho cây trồng phát triển.

### **3.4. Trong y học**

- Sản xuất kháng sinh như penicillin, streptomycin... để điều trị các bệnh do vi khuẩn.
- Điều chế ra các giải độc tố để điều trị bệnh uốn ván, bạch hầu.
- Sản xuất vaccine để phòng bệnh.
- Mô hình để nghiên cứu về di truyền phân tử, hoá sinh học.

### **3.5. Trên cơ thể người**

- Các vi khuẩn cư trú ở đường ruột tham gia vào quá trình hấp thu chất dinh dưỡng của người.
- Một số vi khuẩn giúp cơ thể tiêu hoá xenlulose, một số khác có khả năng tổng hợp vitamin B1, K, B12.
- Một số tiết ra những chất có thể ức chế sự nhân lên của vi khuẩn khác như *E. coli* tiết ra colixin.
- Cạnh tranh sinh học, ngăn cản vi sinh vật gây bệnh xâm lấn.

## **4. Phân biệt các vi sinh vật**

- **Virus:** Không phải là tế bào, chúng chỉ có vật liệu di truyền ADN hoặc ARN nhưng không có màng tế bào, bào tương và bộ máy tổng hợp phân tử. Sự nhân lên của virus hoàn toàn phụ thuộc vào tế bào vật chủ. Các chất liệu di truyền được đóng trong một vỏ. Một số virus chậm có thể còn thiếu acid nucleic, chỉ có các tiểu thể protein gây nhiễm trùng.

	Virus	Vi khuẩn	Ký sinh trùng		
			Nấm men	Đơn bào	Giun - sán
Acid nucleic	ADN hoặc ARN	ADN và ARN	ADN và ARN	ADN và ARN	ADN và ARN
Màng nhân	Không	Không	Có	Có	Có
Vách ngoài tế bào	Không	Đa số có	Có	Không	Không
Nhạy cảm kháng sinh	Không	Có	Không	Một số	Không
Sinh sản ở tế bào vật chủ	Trong tế bào vật chủ	Trong và ngoài tế bào vật chủ	Trong và ngoài tế bào vật chủ	Trong và ngoài tế bào vật chủ	Ngoài tế bào vật chủ.
Hình thức sinh sản	Cấp số nhân	Phân đôi	Phân đôi và giao phối	Phân đôi và giao phối	Giao phối.

Ký sinh trùng (m- $\mu$ m)	$1\text{ m}$	Sán	Mắt thường
		Giun	
	$10^{-3}$	Trứng giun	KHV độ phóng đại nhỏ (X10 - X40)
		Đơn bào - Amip	KHV độ phóng đại lớn (X40- X100)
Vi khuẩn ( $\mu$ m)	$10^{-3}$	KST sốt rét	
		Tụ cầu vàng	KHV độ phóng đại lớn (X100)
Virus (nm)	$10^{-6}$	Poxvirus	KHV điện tử (X1.000)
		Influenzaevirus	
		Poliovirus	

- **Vi khuẩn:** Là một tế bào, mỗi tế bào có chất liệu di truyền ADN, bào tương và bộ máy tổng hợp được bao bọc xung quanh bởi màng tế bào. Chúng không có màng nhân, không có bộ máy phân bào, lưới nội bào, ty thể, lạp thể.

- **Tế bào của sinh vật đa bào:** Gồm nhiều tế bào, có chất liệu di truyền ADN, bào tương và bộ máy tổng hợp được bao bọc xung quanh bởi màng tế

bào, có màng nhân, sự nhân lên cần có ARN thông tin. Có đầy đủ các cơ quan trong bào tương như ty thể, lạp thể, lyzosome, thể golgi, có màng dày để bảo vệ.

#### **4.1. Phân biệt vi sinh vật dựa vào cấu trúc**

#### **4.2. Phân biệt vi sinh vật dựa vào kích thước**

### **5. Vai trò của phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng**

#### **5.1. Chẩn đoán bệnh nhiễm khuẩn**

Phát hiện chính xác các vi sinh vật gây bệnh cho cơ thể con người có mặt trong quá trình bệnh nhân bị bệnh nhiễm khuẩn bằng:

- Phương pháp nuôi cấy và phân lập: Vi sinh vật có khả năng phát triển trên môi trường nuôi cấy nhân tạo.
- Phát hiện kháng nguyên của thành tế bào, các sản phẩm ngoại bào, các độc tố, phản ứng chuỗi PCR, xác định các sản phẩm đặc biệt của vi sinh vật bằng phương pháp không nuôi cấy.
- Phát hiện các kháng thể đặc hiệu với các tác nhân gây bệnh thương hàn, viêm não, sốt xuất huyết.

#### **5.2. Điều trị bệnh**

- Tiến hành kỹ thuật kháng sinh đồ, đánh giá mức độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn giúp các bác sĩ lâm sàng lựa chọn kháng sinh điều trị thích hợp.
- Giám sát mức độ đề kháng kháng sinh của vi khuẩn, từ đó giúp việc xây dựng các phác đồ điều trị, chiến lược sử dụng kháng sinh hợp lý và hiệu quả.

#### **5.3. Dự phòng các bệnh truyền nhiễm**

Cung cấp thông báo về dịch tễ học, xác định nguồn thông thường của bệnh nhiễm khuẩn để đề xuất ra các biện pháp vệ sinh phòng bệnh có hiệu quả, góp phần đáng kể trong công tác phòng chống bệnh dịch.

## Bài 2

# HÌNH THỂ, CẤU TRÚC VÀ SINH LÝ CỦA VI KHUẨN CÁC VI KHUẨN GÂY BỆNH THƯỜNG GẶP

### Mục tiêu

1. Mô tả được hình thể, kích thước của vi khuẩn.
2. Mô tả được cấu trúc cơ bản của tế bào vi khuẩn.
3. Trình bày được chức năng sinh lý của vi khuẩn.
4. Kể được tên một số vi khuẩn gây bệnh thường gặp.

### 1. Khái niệm

Vi khuẩn là những sinh vật đơn bào hạ đẳng, không có màng nhân (procaryote).

Vi khuẩn có cấu trúc và hoạt động đơn giản hơn nhiều so với các tế bào có màng nhân (eucaryote). Tuy nhiên chúng chỉ có một cơ quan như vách tế bào hay chức năng di truyền và sự vận chuyển di truyền phức tạp không kém sinh vật phát triển.

### 2. Hình thể và kích thước của vi khuẩn

#### 2.1. Cầu khuẩn (Cocci)

- Hình cầu hoặc ovan
  - + Xếp đầm như chùm nho (*Staphylococcus aureus*: Tụ cầu vàng)
  - + Xếp dây, xếp chuỗi (*Streptococcus pyogenes*: Liên cầu A)
  - + Xếp đôi hình ngọn nến (*Streptococcus pneumoniae*: Phé cầu)
- Kích thước: Đường kính trung bình khoảng 1 µm.

#### 2.2. Trục khuẩn (Bacilli)

- Hình dạng:
  - + Hình thẳng, hình que, đầu tròn, hoặc vuông.
  - + Hình cong dấu phẩy, cánh chim.
  - + Hình cầu trực khuẩn.
  - + Dạng có nha bào và không nha bào.

- + Xếp đơn, xếp X,V, xếp dây.
- Kích thước  $1 \mu\text{m} \times 2 - 5 \mu\text{m}$ .

### **2.3. Xoắn khuẩn (*Spirochaet*)**

- Hình sợi, lượn sóng.
- Kích thước  $30 \mu\text{m}$

## **3. Cấu tạo của tế bào vi khuẩn**

### **3.1. Nhân**

- Nhân là một phân tử ADN vòng tròn, xoắn kép, khép kín, được xếp gấp bó xoắn thành vòng nhân, không có màng ngăn cách với bào tương. ADN nhân lén trước sự nhân lên của tế bào nên có thể thấy 2-4 nhân trong một tế bào.

- Ngoài nhân, trong bào tương còn có các plasmid. Đó là những phân tử ADN dạng vòng tròn, khép kín có thể mang các gen tạo thêm cho vi khuẩn một số tính chất như tính kháng thuốc.

### **3.2. Bào tương**

### **3.3. Màng bào tương và mạc thể**

### **3.4. Vách**

Vách có ở mọi vi khuẩn, trừ *Mycoplasma*. Vách cứng nhưng đàn hồi.

#### **3.4.1. Cấu tạo hóa học**

Cấu tạo chủ yếu của vách là peptidoglycan (glycopeptid hoặc murein).

Cấu trúc đặc biệt này chỉ có ở vi khuẩn mà không có ở động vật, thực vật.

- Vi khuẩn Gram dương: vách tế bào cấu tạo bởi peptidoglycan dày khoảng  $20 - 80 \text{ nm}$  hình thành bên ngoài mặt của tế bào.

- Vi khuẩn Gram âm: vách tế bào cấu tạo bởi peptidoglycan dày khoảng  $5 - 10 \text{ nm}$ , có thêm một lớp ngoài lipopolysaccharid.

#### **3.4.2. Nhiệm vụ**

- Bảo vệ vi khuẩn, giữ cho vi khuẩn có hình thể không đổi.
- Tham gia sự phân chia tế bào.
- Đóng vai trò quan trọng trong nhuộm Gram để phân biệt vi khuẩn Gram dương và Gram âm.
- Vách chứa nội độc tố vi khuẩn Gram âm đóng vai trò trong việc gây bệnh.
- Mang các vị trí tiếp nhận đặc hiệu cho phage.

- Giúp vi khuẩn bám vào tế bào vật chủ trong quá trình tiếp hợp.
- Mang những kháng nguyên quan trọng của vi khuẩn.
- Bảo vệ vi khuẩn chống lại hệ thống miễn dịch của vật chủ và tác nhân điều trị hoá học như kháng sinh.

### **3.5. Vỏ**

- Chỉ có ở một số vi khuẩn.
- Có thể là polysaccharid hoặc polypeptid.
- Vỏ mang tính kháng nguyên hoặc một số yếu tố độc lực của vi khuẩn.

### **3.6. Lông**

- Lông là những sợi mảnh, bản chất là protein, xuất phát từ bào tương, xuyên qua màng và vách vi khuẩn.
- Lông có thể ở xung quanh thân, ở một hoặc hai đầu của vi khuẩn.
- Lông là một kháng nguyên tốt.
- Lông giúp cho vi khuẩn có khả năng di động.

### **3.7. Pili**

- Pili chung: Là một yếu tố độc lực, giúp vi khuẩn bám vào mặt tế bào.
- Pili giới tính: Chỉ có ở vi khuẩn đực F (+). Nó tham gia vào sự vận chuyển di truyền.

### **3.8. Nha bào**

- Nha bào là một trạng thái tồn tại đặc biệt, chỉ gặp ở một số vi khuẩn có khả năng đề kháng rất cao với các yếu tố ngoại cảnh. Sự hình thành nha bào là một quá trình phức tạp bao gồm quá trình mất nước của bào tương, sự hình thành vách, vỏ không thấm nước. Nha bào gần như không có chuyển hoá. Khi gặp điều kiện thuận lợi nha bào trở lại trạng thái bình thường.
- Nha bào có ý nghĩa lớn trong sự tồn tại của vi khuẩn và trong xếp loại chẩn đoán vi sinh vật.

## **4. Sinh lý của vi khuẩn**

### **4.1. Dinh dưỡng**

Tất cả các vi khuẩn gây bệnh đều là vi khuẩn dị dưỡng. Nhu cầu dinh dưỡng của vi khuẩn rất lớn gồm các acid amin, đường, muối khoáng, nước.

#### **4.2. Chuyển hoá**

Vi khuẩn chuyển hoá nhờ hệ thống enzym phong phú. Xác định khả năng chuyển hoá các chất (tính chất sinh vật hoá học) là một tính chất quan trọng để phân loại và xác định vi khuẩn.

#### **4.3. Hô hấp**

Dựa vào hô hấp người ta phân loại vi khuẩn thành:

- Vi khuẩn hiếu khí: Cần oxy tự do. Oxy là chất nhận điện tử cuối cùng.
- Vi khuẩn kỵ khí: Không sống được với oxy tự do. Chúng tự phân tích lấy oxy từ các hợp chất như CO<sub>2</sub>.
- Vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí tuỳ tiện: Có thể sống được ở cả môi trường hiếu khí và kỵ khí.

#### **4.4. Sinh sản**

Vi khuẩn sinh sản theo kiểu trực phân, mỗi tế bào phân chia thành hai tế bào mới. ADN nhân lên thành hai nhiễm sắc thể mới. Mạc thể và vách tế bào phối hợp phân cắt tế bào thành hai. Trong những điều kiện thích hợp, sự phân chia này diễn ra rất nhanh (20 - 30 phút với *E. coli*). Có những vi khuẩn chậm hơn (36 giờ với vi khuẩn lao).

#### **4.5. Sự phát triển của vi khuẩn**

##### **4.5.1. Trên môi trường đặc**

Tạo thành những khuẩn lạc. Khuẩn lạc là một quần thể sinh ra từ một vi khuẩn.

##### **4.5.2. Trên môi trường lỏng**

Chia thành 4 giai đoạn:

- Giai đoạn thích ứng: Khoảng 2 giờ. Số lượng vi khuẩn không thay đổi, vi khuẩn chuyển hoá mạnh chuẩn bị cho sự phân bào.
- Giai đoạn tăng theo hàm số mũ: Khoảng 10 giờ. Tốc độ phát triển nhanh dần. Số lượng vi khuẩn tăng theo bội số, chuyển hoá vi khuẩn ở mức lớn nhất.
- Giai đoạn dừng tối đa: Khoảng 3-4 giờ. Tốc độ sinh sản giữ nguyên ở mức độ cao nhưng có sự già nua và chết của vi khuẩn tăng lên làm cho số lượng vi khuẩn chỉ tăng chút ít.

- Giai đoạn suy tàn: Sau giờ thứ 15. Tốc độ sinh sản giảm dần, sự chết của vi khuẩn tăng lên. Trong môi trường chất dinh dưỡng còn ít, chất độc do chuyển hóa tăng lên quá nhiều làm ảnh hưởng trực tiếp đến sự sống của vi khuẩn.

## 5. Các vi khuẩn gây bệnh thường gặp

### 5.1. Cầu khuẩn

#### 5.1.1. Cầu khuẩn Gram dương

- *Staphylococcus aureus* (Tụ cầu vàng): Xếp đám hình chùm nho.
- *Streptococcus pyogenes* (Liên cầu nhóm A, tan máu β): Xếp dây, xếp chuỗi.
- *Enterococcus faecalis* (Cầu khuẩn đường ruột): Xếp đôi, xếp chuỗi ngắn.
- *Streptococcus pneumoniae* (Phé cầu): Song cầu xếp đôi hình ngọn nến.

#### 5.1.2. Cầu khuẩn Gram âm

- *Neisseria meningitidis* (Não mô cầu) Xếp thành đôi hạt cà phê.
- *Neisseria gonorrhoeae* (Lậu cầu) Xếp thành đôi hạt cà phê.

### 5.2. Trực khuẩn

#### 5.2.1. Trực khuẩn Gram âm

- *Enterobacteriaceae*: Các trực khuẩn Gram âm họ vi khuẩn đường ruột như *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp.*, *Shigella spp.* (trực khuẩn lỵ), *Salmonella typhi* (trực khuẩn thương hàn)...
  - *Pseudomonas aeruginosa* (Trực khuẩn mủ xanh): Các vi khuẩn không lên men đường.
  - *Acinetobacter baumannii*.
  - *Vibrio cholerae* (Phảy khuẩn tả): Cong hình đầu phảy.
  - *Campylobacter*: Hình cánh chim, hình đầu ngã.

#### 5.2.2. Trực khuẩn Gram dương

- Có nha bào: *Bacillus*, *Lactobacillus*
- Không có nha bào: *Corynebacterium diphtheriae* (Bạch hầu)

### 5.3. Xoắn khuẩn

- *Treponema*: *T. pallidum* (Giang mai)
- *Borrelia* (Sốt hồi quy)
- *Leptospira* (Sốt vàng da)

#### **5.4. Vi sinh vật biến hình không có vách**

- *Mycoplasma*: *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*
- *Ureaplasma*: *U. urealyticum*

#### **5.5. Vi sinh vật ký sinh bắt buộc trong tế bào**

- *Rickettsia*: *R. Rickettsii*.
- *Coxiella*.
- *Chlamydia*: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*.

## Bài 3

# ĐẠI CƯƠNG VỀ VIRUS

### Mục tiêu

1. Trình bày được định nghĩa virus, tính chất chung của virus và cấu trúc của virus.
2. Kể tên và giải thích các giai đoạn trong quá trình nhân lên của virus và hậu quả của sự nhân lên.
3. Trình bày được cách lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm chẩn đoán virus.
4. Kể tên các phương pháp chẩn đoán virus trong phòng xét nghiệm.

### 1. Định nghĩa

Virus là một đơn vị sinh học có khả năng biểu thị những tính chất cơ bản của sự sống với điều kiện nó tìm thấy trong tế bào cảm thụ những điều kiện cần thiết cho sự nhân lên của nó.

### 2. Đặc tính chung của virus

#### 2.1. Kích thước

Virus có kích thước rất nhỏ từ vài chục đến vài trăm nanomet (nm), loại to nhất độ 300nm. Do kích thước nhỏ nên không thể nhìn thấy được ở kính hiển vi thường mà phải quan sát dưới kính hiển vi điện tử có độ phóng đại hàng vạn lần.

#### 2.2. Hình thể

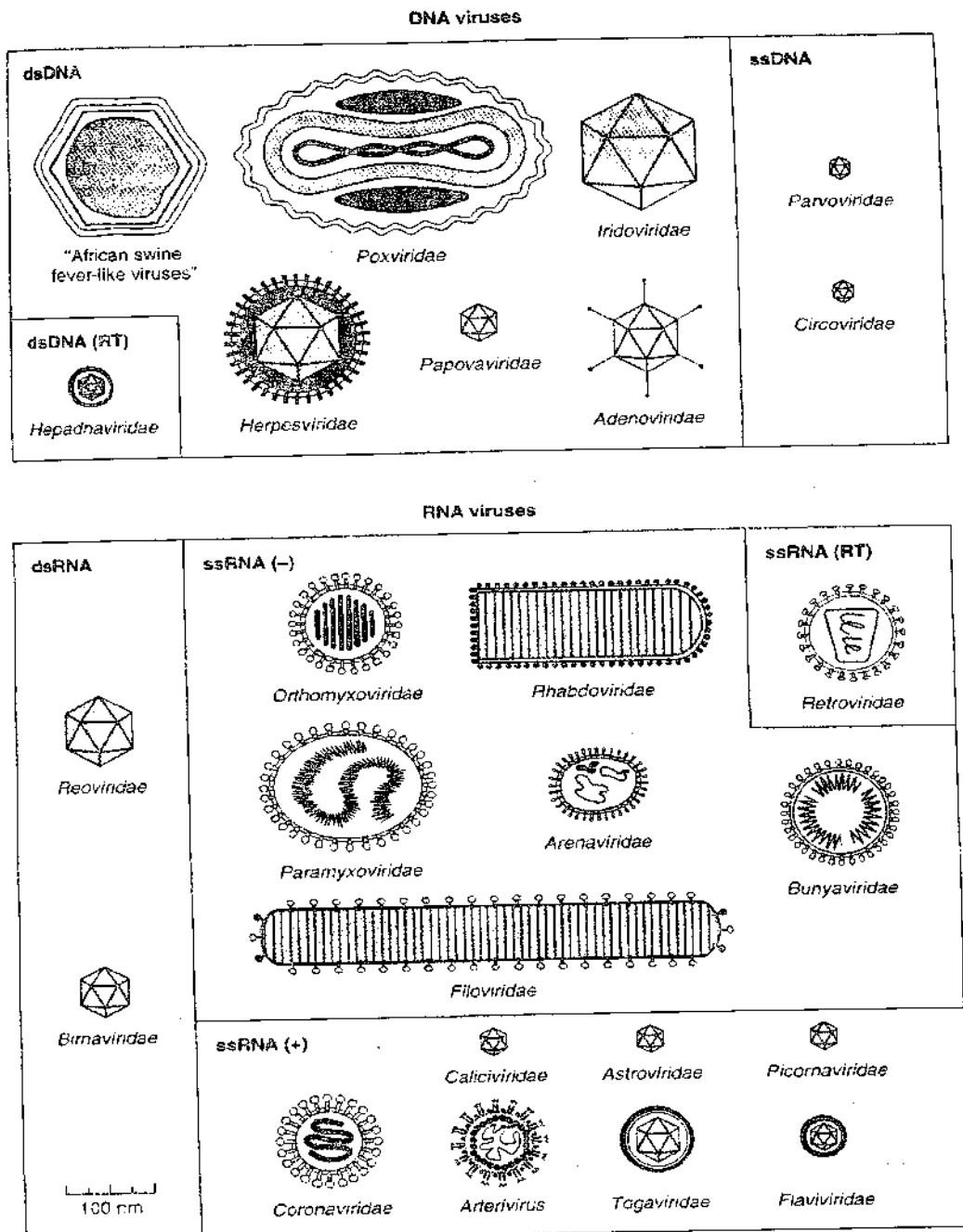
Virus có hình thể rất đa dạng: hình que, hình sợi, hình cầu, hình khối... đặc trưng theo loài.

#### 2.3. Tính đặc hiệu

Mỗi loại virus nhất định có một đặc điểm chủ yếu và gây ra một bệnh nhất định trong quá trình nhân lên.

#### 2.4. Acid nucleic

Mỗi loại virus chỉ chứa một loại acid nucleic, hoặc ADN hoặc ARN mà không bao giờ chứa cùng một lúc cả hai loại acid nucleic như vi khuẩn.



**Hình 1. Hình ảnh virus động vật**  
(nguồn từ Field Virology Fifth edition)

### 2.5. Tính chất ký sinh

Virus không có khả năng phát triển và tự nhân lên mà chỉ có thể tự nhân lên khi xâm nhập vào tế bào sống. Trong quá trình nhân lên, chỉ có acid nucleic là có vai trò quyết định, còn các thành phần khác có vai trò hỗ trợ.

Virus không chứa những thông tin di truyền cho việc tổng hợp ra những chất chuyển hoá cơ bản và năng lượng cần thiết cho nó. Chính vì vậy mà virus phải phụ thuộc vào các vi sinh vật khác, nhân lên bằng cách dùng hệ thống men của tế bào, còn acid nucleic của virus điều khiển việc tổng hợp của tế bào trong quá trình sản xuất ra những virus mới.

### 2.6. Sức đề kháng của virus

Nhìn chung virus chịu được lạnh, không chịu được nóng và tia tử ngoại, do đó muốn giữ chủng virus, người ta để virus ở nhiệt độ lạnh.

Virus chịu ảnh hưởng của các chất sát khuẩn như Formol, cồn, acid và kiềm mạnh. Virus không bị mất độc lực trong dung dịch glycerin. Hầu hết virus không bị kháng sinh tác động đến.

## 3. Cấu trúc của virus

Virus có cấu trúc rất đơn giản, không có enzym hô hấp và enzym chuyển hoá, vì vậy virus bắt buộc phải ký sinh trong tế bào cảm thụ.

### 3.1. Cấu trúc cơ bản

Cấu trúc cơ bản còn được gọi là cấu trúc chung của virus. Cấu trúc cơ bản gồm hai thành phần mà mỗi virus đều phải có.

#### 3.1.1. Lõi

Mỗi hạt virus hoàn chỉnh đều có lõi là một trong hai loại acid nucleic: ADN (acid deoxyribonucleic) hoặc ARN (acid ribonucleic). Virus mang ARN thì thường là một sợi. Virus mang ADN thường là hai sợi.

Các acid nucleic (AN) chỉ chiếm 1-2% trọng lượng hạt virus nhưng có chức năng đặc biệt quan trọng: Mang mọi mật di truyền đặc trưng cho từng loại virus.

Quyết định khả năng gây nhiễm trùng của virus trong tế bào cảm thụ.

Quyết định chu kỳ nhân lên của virus trong tế bào cảm thụ.

Mang tính bán kháng nguyên đặc hiệu của virus.

#### 3.1.2. Capsid

Là cấu trúc bao quanh AN. Bản chất hoá học là protein. Capsid được cấu tạo nên bởi các đơn vị cấu trúc hay còn gọi là capsomer, là những phân tử

protein giống hệt nhau.. Các đơn vị capsid được sắp xếp một cách chính xác, đặc trưng cho từng loại virus. Cùng với phần lõi AN của virus, “vỏ” capsid có thể sắp xếp đối xứng xoắn, đối xứng khôi hoặc đối xứng khôi phức hợp. Capsid có vai trò quan trọng.

Bao quanh AN để bảo vệ AN không bị các enzym nuclease phá huỷ

Giúp hạt virus bám vào những vị trí đặc hiệu của tế bào cảm thụ (với các virus không có bao envelop).

Mang tính kháng nguyên đặc hiệu của virus.

Giữ cho hình thái và các kích thước của virus luôn được ổn định.

### 3.2. Cấu trúc riêng

Cấu trúc riêng còn được gọi là cấu trúc đặc biệt, chỉ có ở một số loài virus nhất định để thực hiện chức năng đặc trưng của virus đó.

#### 3.2.1. Cấu trúc bao ngoài (envelop)

Một số virus bên ngoài lớp capsid còn bao phủ một lớp ngoài, được gọi là envelop. Envelop được cấu tạo bởi phức hợp: protein-lipid-carbohydrat. Nếu chỉ có màng thì đó là lớp dilipid. Nếu có thêm gai nhú thì đó là glycoprotein. Envelop có vai trò;

Tham gia vào sự bám của virus trên các vị trí thích hợp của tế bào cảm thụ.

Tham gia vào giai đoạn lắp ráp và giải phóng virus ra khỏi tế bào sau chu kỳ nhân lên.

Tham gia vào hình thành tính ổn định kích thước và hình thái của virus

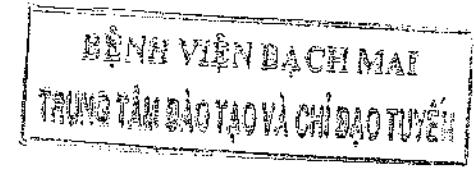
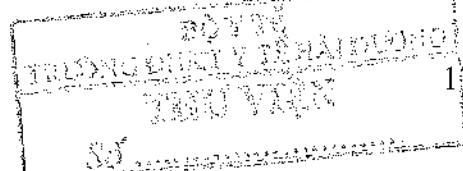
Tạo nên các kháng nguyên đặc hiệu trên bề mặt virus.

#### 3.2.2. Chất ngưng kết hồng cầu

Chất này có khả năng gây ngưng kết hồng cầu của một số loài động vật. Chất ngưng kết hồng cầu là một loại kháng nguyên mạnh.

#### 3.2.3. Enzym

Virus không có enzym chuyển hoá và hô hấp, nhưng có enzym cấu trúc, nó gắn với cấu trúc virus hoàn chỉnh như ADN polymerase, A polymerase, enzym sao chép ngược... Các enzym này tham gia vào quá trình nhân lên của virus và mang tính kháng nguyên riêng, đặc hiệu ở mỗi loại virus.



#### **4. Sự nhân lên của virus**

Virus chỉ có thể nhân lên trong tế bào cảm thụ. Nhờ hoạt động của tế bào mà virus tổng hợp được các thành phần cấu trúc và tạo ra các hạt virus mới. Quá trình này có thể chia thành 5 giai đoạn.

##### **4.1. Giai đoạn hấp phụ của virus lên bề mặt tế bào**

Virus vận chuyển trong dịch gian bào để tìm tới các tế bào cảm thụ. Các thụ thể đặc hiệu trên bề mặt tế bào cảm thụ sẽ cho các vị trí cấu trúc đặc hiệu của virus gắn vào.

##### **4.2. Giai đoạn xâm nhập**

Virus xâm nhập vào tế bào theo cơ chế âm bào. Sau khi hấp phụ vào tế bào cảm thụ hoặc nhờ phần vỏ capsid co bóp, bơm AN qua vách tế bào, xâm nhập vào trong tế bào cảm thụ. Tiếp theo nhờ enzym cởi vỏ của tế bào(enzym decapsidase) giúp virus cởi vỏ, giải phóng acid nucleic nhờ enzym decapsidase.

##### **4.3. Sự tổng hợp các thành phần cấu trúc của virus**

Đây là giai đoạn phức tạp nhất của quá trình nhân lên của virus và nó phụ thuộc lại AN của virus. Nhưng kết quả cuối cùng là để tổng hợp được AN và các thành phần cấu trúc khác của virus.

##### **4.4. Giai đoạn lắp ráp**

Nhờ enzym cấu trúc của virus hoặc enzym của tế bào cảm thụ giúp cho các thành phần cấu trúc của virus được lắp ráp theo khuôn mẫu của virus gây bệnh tạo thành những hạt virus mới.

##### **4.5. Sự giải phóng các hạt virus ra khỏi tế bào**

Virus có thể phá vỡ vách tế bào hoặc giải phóng theo cách nảy chồi tùng hạt virus ra khỏi tế bào sau chu kỳ nhân lên để giải phóng hàng loạt virus ra khỏi tế bào, tiếp tục xâm nhập vào tế bào cảm thụ để tiếp tục một chu kỳ nhân lên mới trong tế bào cảm thụ.

#### **5. Hậu quả của sự tương tác virus và tế bào**

##### **5.1. Huỷ hoại tế bào chủ**

Sau khi virus xâm nhập và nhân lên trong tế bào thì hầu hết các tế bào bị phá huỷ. Có những tế bào bị nhiễm virus chưa đến mức bị chết, nhưng

chức năng của tế bào này đã bị thay đổi. Biểu hiện của sự nhiễm virus thành các bệnh nhiễm trùng cấp hoặc慢 tính là do sự huỷ hoại tế bào của virus.

### **5.2. Sự sai lạc nhiễm sắc thể của tế bào**

Sau khi virus nhân lên bên trong tế bào, nhiễm sắc thể của tế bào có thể bị gãy, bị phân mảnh hoặc có sự sắp xếp lại và gây ra các hậu quả như:

*5.2.1. Dị tật bẩm sinh, thai chết lưu:* sự sai lạc nhiễm sắc thể thường gây những tai biến đặc biệt ở phụ nữ có thai trong những tháng đầu, chu kỳ gây bệnh của virus trên phụ nữ có thai có thể biểu hiện bởi dị tật thai, hoặc thai chết lưu.

*5.2.2. Sinh khói u và ung thư:* virus làm thay đổi kháng nguyên bề mặt của tế bào, làm mất khả năng ức chế do tiếp xúc khi tế bào sinh sản hoặc kích hoạt gen ung thư.

### **5.3. Tạo hạt virus không hoàn chỉnh (DIP: Defective interfering particle)**

Đó là những hạt virus không có hoặc có không hoàn chỉnh acid nucleic.

### **5.4. Tạo ra tiểu thể**

Các tế bào nhiễm virus có thể xuất hiện các hạt nhỏ trong nhân hoặc trong bào tương của tế bào. Bản chất các tiểu thể có thể là các hạt virus không giải phóng khỏi tế bào, các thành phần cấu trúc của virus chưa được lắp ráp thành hạt virus mới, cũng có thể là các hạt phản ứng của tế bào khi nhiễm virus.

### **5.5. Tế bào tiềm tan**

Các virus ôn hòa xâm nhập vào tế bào, vật liệu di truyền của virus sẽ tích hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào rồi phân chia cùng tế bào. Các tế bào mang gen ôn hòa khi bị kích thích bởi các tác nhân sinh học, hoá học và lý học thì vật liệu di truyền của virus ôn hòa trở thành virus độc lực có thể gây ly giải tế bào.

### **5.6. Sản xuất interferon**

Interferon bản chất là protein do tế bào sản xuất ra khi cảm thụ với virus. Interferon có thể ức chế sự hoạt động của ARNm, do vậy nó được sử dụng như một thuốc điều trị không đặc hiệu cho mọi nhiễm trùng do virus.

## **6. Các phương pháp chẩn đoán virus**

Để chẩn đoán được bệnh do virus gây ra, ngoài triệu chứng lâm sàng thì việc chẩn đoán phòng thí nghiệm có giá trị chắc chắn.

### *6.1. Thu thập mẫu để chẩn đoán virus*

Thu thập mẫu bệnh phẩm để chẩn đoán virus cần phải chú ý thời gian lấy mẫu sau khi mắc, vị trí lấy mẫu, cách bảo quản và vận chuyển vì tất cả điều này liên quan đến kết quả chẩn đoán phòng thí nghiệm. Để phân lập virus, mẫu bệnh phẩm cần thu thập trong giai đoạn sớm của bệnh và trong suốt thời gian đào thải của virus. Để chẩn đoán huyết thanh học, các mẫu huyết thanh lấy trong giai đoạn cấp và giai đoạn phục hồi cần phải lấy đúng thời gian quy định Thời gian lấy máu: lần thứ nhất sau 3, 4 ngày từ khi bệnh khởi phát; lần thứ 2 cách lần đầu 10 ngày tới 2 tuần. Huyết thanh 2 lần được bảo quản ở - 20°C để làm phản ứng trong cùng thời gian. Việc lựa chọn loại mẫu để thu thập đối với từng loại bệnh đòi hỏi phải có sự hiểu biết về bệnh sinh của bệnh đó.

### *6.2. Chẩn đoán trực tiếp*

#### *6.2.1. Bệnh phẩm để chẩn đoán trực tiếp*

Bệnh phẩm có thể là dịch họng mũi, máu, nước não tuỷ hay là đoạn ruột, mảnh não, mảnh tuỷ sống...

Tất cả mọi bệnh phẩm dùng trong chẩn đoán trực tiếp đều phải bảo quản cẩn thận, tránh làm lây lan, giữ trong dây chuyền lạnh và gửi trong thời gian ngắn nhất: từ một giờ đến vài giờ.

#### *6.2.2. Nuôi cấy virus từ bệnh phẩm lâm sàng*

Các bệnh phẩm lấy ở vị trí vô trùng (máu, nước não tuỷ, mảnh tổ chức sinh thiết...) thì không cần xử lý kháng sinh – ngược lại, nếu bệnh phẩm lấy ở vị trí không vô trùng (nước họng mũi, nước tiểu, phân...) cần xử lý diệt vi khuẩn và nấm bằng các kháng sinh ở nồng độ thích hợp không ảnh hưởng tới virus. Sau khi nuôi cấy virus trên các dòng tế bào nhạy cảm hoặc trên động vật thí nghiệm, quan sát các biểu hiện bệnh lý trên tế bào hoặc trên động vật để thu gặt các mẫu virus nghi ngờ và tiếp tục định loại bằng các kỹ thuật thích hợp.

### *6.3. Các phương pháp phát hiện kháng nguyên*

Vì các kỹ thuật phân lập tốn kém thời gian hoặc kinh phí, nên hiện nay các phương pháp phát hiện virus trực tiếp từ bệnh phẩm bằng các kỹ thuật

miễn dịch (huỳnh quang trực tiếp, ELISA, ngưng kết gián tiếp), phát hiện vật liệu di truyền (PCR, lai phân tử...). Người ta có thể thấy cấu trúc đặc hiệu của virus khi bệnh phẩm được quan sát dưới kính hiển vi điện tử.

#### 6.3.1. Chẩn đoán gián tiếp (*Phương pháp huyết thanh học – serology*)

##### 6.3.1.1. Các phản ứng huyết thanh tìm kháng thể

*Có rất nhiều phản ứng được sử dụng để tìm kháng thể nhưng thông dụng nhất hiện nay là:*

- Phản ứng ELISA tìm IgM để chẩn đoán nhiễm trùng giai đoạn sớm.
- Phản ứng ELISA tìm IgG.
- Phản ứng ngưng kết
- Hoá phát quang
- Điện hoá phát quang
- Sắc ký miễn dịch
- Phản ứng Western blot.

##### 6.3.1.2. Nhận định kết quả

- Các phản ứng ELISA và Western blot được đánh giá là dương tính (+) theo quy định của các kít mẫu thử.
- Các phản ứng định lượng khác, hiệu giá huyết thanh trong mẫu lần 2 phải tăng gấp 4 lần so với mẫu máu lần 1 mới kết luận là bệnh nhân mắc bệnh.

## 7. Phòng bệnh

### 7.1. Phòng không đặc hiệu

Các biện pháp cách ly bệnh nhân, khử trùng tiệt trùng dụng cụ và môi trường, diệt côn trùng truyền bệnh được áp dụng thích hợp trong từng bệnh, từng vụ dịch.

### 7.2. Phòng bệnh đặc hiệu

Mỗi lứa tuổi, các nghề nghiệp khác nhau có thể sử dụng vaccine thích hợp.

## 8. Điều trị bệnh

### 8.1. Một số bệnh cấp tính: có thể nguy hại đến tính mạng bệnh nhân, có thể dùng γ – globulin để điều trị.

### **8.2. Hoá dược trị liệu**

Hoá dược và kháng sinh điều trị bệnh do virus phải đạt tiêu chuẩn không gây hại cho tế bào chủ. Hiện nay đang sử dụng một số hoá dược sau:

- Aciclovir: dùng cho điều trị virus Herper và Varicella- Zoster virus.
- Amantadin: dùng điều trị cúm, á cúm, sốt phát ban. Dẫn chất của Amantadin là rimantadin điều trị hiệu quả hơn và ít tác dụng phụ.
- Azidothymidin (AZT) dùng để điều trị các bệnh do virus có enzym sao chép ngược như họ Retrovirus, HepaADNvirus.

**8.3. Interferon:** có các loại interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – trong đó interferon  $\alpha$  được dùng điều trị có hiệu quả cao trong các bệnh do virus, trong thời kỳ đầu nhiễm virus vì tác dụng chủ yếu của interferon ở giai đoạn sao chép mât mã di truyền của virus. Để có hiệu quả điều trị, liều interferon dùng để điều trị phải cao, nên cần theo dõi cẩn thận, tránh tác hại của tác dụng phụ.

## Bài 4

# MỘT SỐ PHẢN ỦNG KHÁNG NGUYÊN – KHÁNG THỂ SỬ DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN VI SINH Y HỌC

### Mục tiêu

1. *Trình bày được tính chất cơ bản của phản ứng KN-KT.*
2. *Trình bày phân loại phản ứng KN-KT trong phòng thí nghiệm.*
3. *Trình bày được nguyên lý của từng loại phản ứng.*
4. *Giải thích được hiện tượng dương tính giả, âm tính giả.*

### 1. Tính chất cơ bản của phản ứng kết hợp kháng nguyên (KN) – kháng thể (KT)

#### 1.1. Tính đặc hiệu cao

Dựa vào đặc điểm một KN chỉ kết hợp với một KT, do nó kích thích tạo ra, phản ứng KN-KT giúp xác định hoặc định lượng một thành phần tham gia phản ứng (KN hoặc KT).

**1.2. Xảy ra trên bề mặt kháng nguyên kháng thể:** có những vị trí KT gắn chính xác với những vị trí tương ứng của KN.

#### 1.3. Phản ứng chỉ có thể xảy ra khi tỷ lệ KN-KT tương đương

Nếu tương quan giữa nồng độ KN và KT không đồng đều, thì phản ứng sẽ không rõ hoặc không xảy ra. Hiện tượng này gọi là hiện tượng tiền vùng.

#### 1.4. Kết quả của sự kết hợp KN-KT

Có lợi: sự kết hợp làm mất tính chất lý học, sinh vật học, độc trở thành không độc, vi khuẩn bị ly giải. Những KT đó gọi là KT miễn dịch

Có hại: khi KN kết hợp với KT ở trong tế bào thì gây nguy hại cho cơ thể. Làm cho các tổ chức giải phóng ra các hóa chất trung gian như histamin, serotonin làm tiêu huỷ protein.

### 2. Mục đích sử dụng các phản ứng KN-KT

#### 2.1. Chẩn đoán các bệnh nhiễm trùng

##### 2.1.1. Chẩn đoán trực tiếp

- Xác định tên vi sinh vật bằng kháng huyết thanh mẫu (huyết thanh có loại KT đã biết).

- Phát hiện trực tiếp KN của vi sinh vật có trong bệnh phẩm.

**2.1.2. Chẩn đoán gián tiếp:** Dùng KN mẫu (đã biết tên) để phát hiện KT đặc hiệu trong các dịch cơ thể, thường là trong huyết thanh (HT).

## **2.2. Nghiên cứu dịch tỦ học của các bệnh nhiễm trùng**

### **2.3. Định loại vi sinh vật**

Dùng kháng HT mẫu chống lại các nhóm hoặc các typ vi sinh vật để định nhóm, định typ.

### **2.4. Nghiên cứu sự đáp ứng của cơ thể đối với KN vi sinh vật**

Một trong những nghiên cứu thuộc loại này là đánh giá hiệu lực đáp ứng miễn dịch của một vacxin.

## **3. Các phản ứng kết hợp KN-KT**

Có rất nhiều phản ứng kết hợp KN- KT được dùng trong vi sinh vật, căn cứ vào cách quan sát nhận định kết quả, có thể xếp thành ba nhóm.

### **3.1. Các phản ứng tạo thành hạt**

Là các phản ứng mà phức hợp KN-KT hình thành dưới dạng những “hạt” có thể quan sát được bằng mắt thường hoặc nhờ kính lúp.

#### **3.1.1. Phản ứng kết tua**

##### **Nguyên lý**

- Phản ứng kết tua là sự kết hợp giữa KN hoà tan (KN ở tầm phân tử) với KT tương ứng, tạo thành các hạt lỏng lẻo có thể quan sát trực tiếp bằng mắt thường hoặc nhờ sự trợ giúp của kính lúp.

- Các phản ứng kết tua có thể thực hiện trên môi trường lỏng hoặc trên gel thạch.

**Ưu điểm:** kỹ thuật đơn giản.

**Nhược điểm:** độ nhạy thấp.

#### **3.1.2. Phản ứng ngưng kết**

**Nguyên lý :** là sự kết hợp giữa KN hữu hình với KT đặc hiệu tương ứng, tạo thành phức hợp KN-KT dưới dạng những hạt ngưng kết có thể được quan sát bằng mắt thường.

### **Điều kiện để hình thành hạt ngưng kết**

Các hạt ngưng kết thực chất là mạng lưới KN-KT. Để có thể hình thành mạng lưới này, ngoài tính đặc hiệu của KN và KT, phải có thêm hai điều kiện cơ bản:

- KN và KT phải đa giá (có nhiều vị trí kết hợp).
- KN và KT phải có nồng độ tương đương.

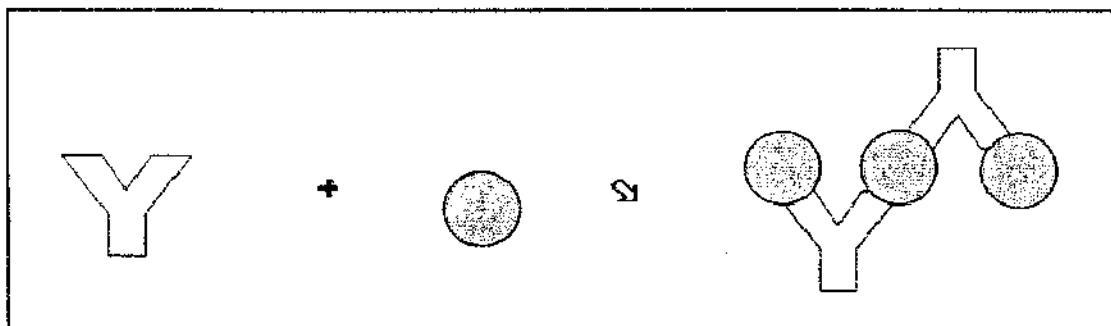
### **Ưu nhược điểm của kỹ thuật**

- **Ưu điểm**
  - + Phản ứng ngưng kết có độ nhạy cao hơn phản ứng kết tủa.
  - + Không tốn thời gian.
  - + Không đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền, có thể thực hiện được ở mọi tuyến cơ sở.
- **Nhược điểm**: không lưu giữ được kết quả.

#### *3.1.3. Phản ứng ngưng kết trực tiếp (ngưng kết chủ động)*

Trong phản ứng ngưng kết trực tiếp, thành phần KN trên tế bào vi khuẩn (hoặc tế bào khác), kết hợp với KT đặc hiệu.

- Ngưng kết định tính trên phiến kính: trộn đều KN vào giọt kháng huyết thanh. Nếu KN gặp KT tương ứng sẽ xuất hiện các đám ngưng kết trên phiến kính. Phản ứng này thường sử dụng để xác định vi khuẩn đường ruột.



*Hình 2. Phản ứng ngưng kết trực tiếp*

- Ngưng kết định lượng trong ống nghiệm: cho một lượng KN như nhau và huyết thanh với nồng độ khác nhau vào một loạt ống nghiệm. Đọc kết quả: xác định hiệu giá KT trong huyết thanh. Ví dụ: phản ứng Widal trong chẩn đoán thương hàn.

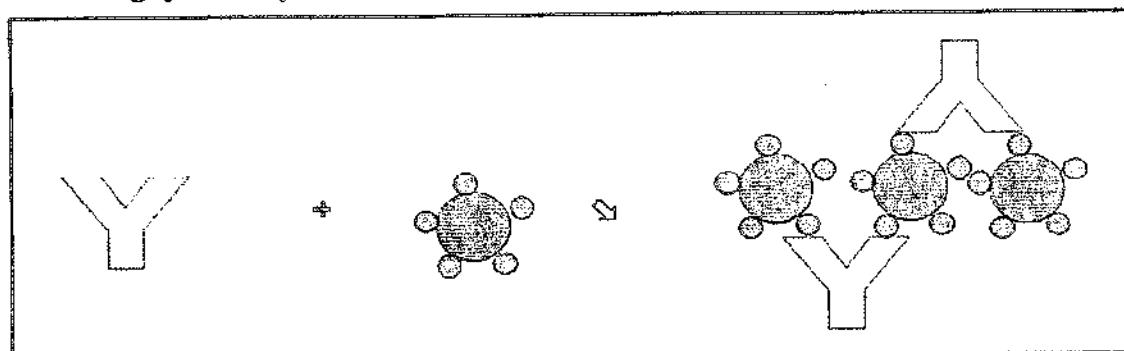
#### *3.1.4. Phản ứng ngưng kết gián tiếp (ngưng kết thụ động)*

Phản ứng này thường được sử dụng khi dùng một KN hoà tan để phát hiện một KT tương ứng bằng hiện tượng ngưng kết. Nguyên lý của phản ứng này là tạo cho KN hoà tan trở thành KN hữu hình bằng cách gắn KN hoà tan lên nền muon hữu hình (thường là hồng cầu, hạt latex, hạt gelatin).

**Ưu điểm:** nhanh, nhạy đơn giản, dễ thực hiện

**Nhược điểm:** dễ cho phản ứng dương tính giả

Ví dụ: phản ứng ASO tìm kháng thể kháng streptolysin O của liên cầu nhóm A gây tan huyết bê ta.



*Hình 3. Phản ứng ngưng kết gián tiếp*

Phản ứng ngưng kết thụ động ngược: để phát hiện KN, người ta lại gắn KT lên “nền muon”. Khi KN gặp KT tương ứng, hiện tượng ngưng kết sẽ xảy ra. Ví dụ: phản ứng ngưng kết thụ động ngược tìm virus Rota.

**Phản ứng ngăn ngưng kết hồng cầu:**

Nguyên lý: một số loại virus có khả năng làm ngưng kết hồng cầu gà, ngỗng, chim và một số loại động vật khác. Khả năng này bị mất khi gặp KT đặc hiệu do KT đã trung hoà KN gây ngưng kết hồng cầu của virus.

Virus + hồng cầu => hồng cầu bị ngưng kết

(Virus + KT đặc hiệu) + Hồng cầu => Hồng cầu không bị ngưng kết

#### 4. Các phản ứng dựa vào hoạt động sinh học của KT

##### 4.1. Phản ứng trung hoà độc lực, độc tố

Nguyên lý: KT đặc hiệu có khả năng trung hoà độc tố của vi khuẩn, độc lực của vi sinh vật, hoặc làm mất đi một tính chất nào đó của vi sinh vật hoặc sản phẩm của nó.

**Ví dụ:** phản ứng trung hoà trên chuột lang để xác định vi khuẩn bạch hầu, phản ứng ASLO để tìm kháng thể kháng streptolysin O của liên cầu tan huyết bê ta nhóm A

#### 4.2. Phản ứng kết hợp bổ thể

**Nguyên lý:** KT đặc hiệu với sự tham gia của bổ thể sẽ gây ly giải tế bào vi khuẩn hoặc một số tế bào động vật khác.

##### Các thành phần của phản ứng kết hợp bổ thể:

- Trong phản ứng kết hợp bổ thể, có hai hệ thống: hệ thống tan máu (KN là hồng cầu cừu và KT là huyết thanh kháng hồng cầu cừu) và hệ thống thử (gồm KN và KT), và một thành phần độc lập là bổ thể. Phản ứng xảy ra theo hai giai đoạn.

1. Cho hệ thống thử tiếp xúc với bổ thể trước, nếu KN (ví dụ giang mai) kết hợp với KT (ví dụ KT kháng giang mai) thì sẽ kết hợp luôn với bổ thể, và do đó sẽ không còn bổ thể tự do nữa.

2. Tiếp đó cho thêm hệ thống tan máu vào.

+ Đọc kết quả: nếu không còn bổ thể tự do, thì hồng cầu cừu không tan: phản ứng dương tính. Tức là trong huyết thanh bệnh nhân có KT giang mai

+ Nếu trong huyết thanh bệnh nhân không có KT giang mai, thì bổ thể vẫn tự do và sẽ kết hợp với hệ thống tan máu gây nên hiện tượng tan hồng cầu cừu: phản ứng âm tính.

### 5. Các phản ứng đánh dấu KT hoặc KN

**Nguyên lý chung:** dùng chất đánh dấu gắn với KN hoặc KT để xác định các phức hợp KN-KT không thể phát hiện được bằng mắt thường

Điều kiện cần thiết là chất đánh dấu không làm thay đổi hoạt tính miễn dịch của KN và KT.

#### 5.1. Miễn dịch huỳnh quang (MDHQ)

Trong MDHQ, chất đánh dấu là chất màu huỳnh quang, kết quả được đọc nhờ kính hiển vi huỳnh quang.

##### MDHQ trực tiếp

- Nguyên lý: KN được phát hiện nhờ KT mầu gắn huỳnh quang.

### Phương pháp MDHQ gián tiếp

- Nguyên lý: sử dụng KN mẫu và kháng KT (KKT) mẫu gắn huỳnh quang để phát hiện KT.

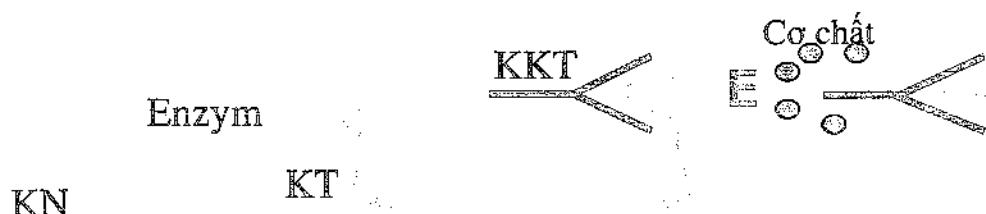
#### 5.2. Phản ứng miễn dịch enzym ELISA

Nguyên lý: phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT hoặc KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Có nhiều kỹ thuật ELISA. Sau đây chỉ giới thiệu 2 kỹ thuật, một để phát hiện KT và một để phát hiện KN:

##### 5.2.1. Kỹ thuật dùng KKT gắn enzym để phát hiện KT

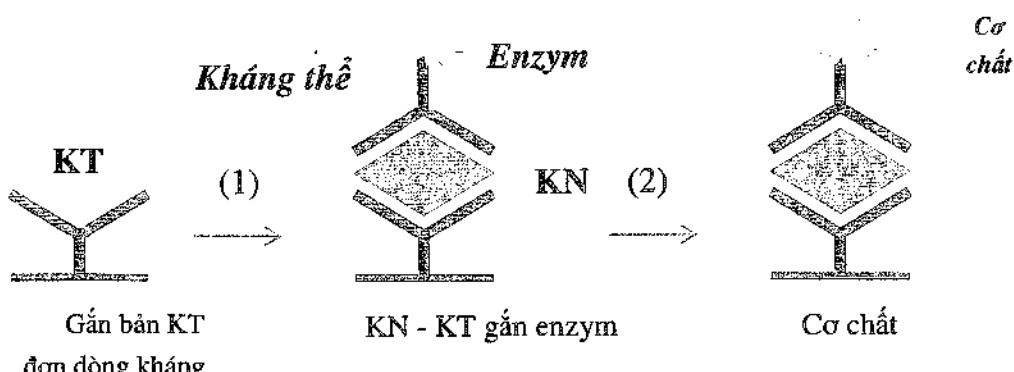
Phản ứng này sử dụng KN mẫu và KKT mẫu gắn enzym. chất



Hình 4. Kỹ thuật dùng KN và kháng kháng thể (KKT)  
gắn enzym để phát hiện KT

##### 5.2.2. Kỹ thuật dùng KKT gắn enzym để phát hiện KN

Phản ứng này sử dụng KT mẫu và KKT mẫu gắn enzym

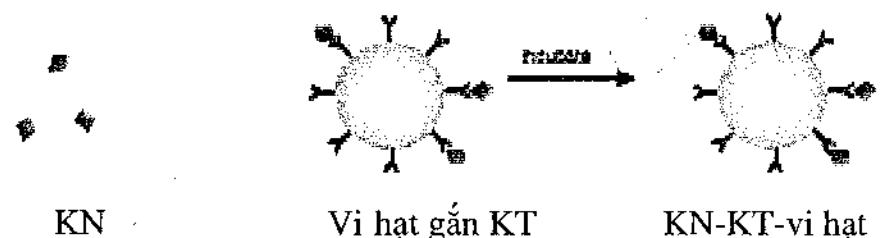


Hình 5. Phản ứng ELISA: kỹ thuật dùng KT mẫu và KKT  
gắn enzym để phát hiện KN

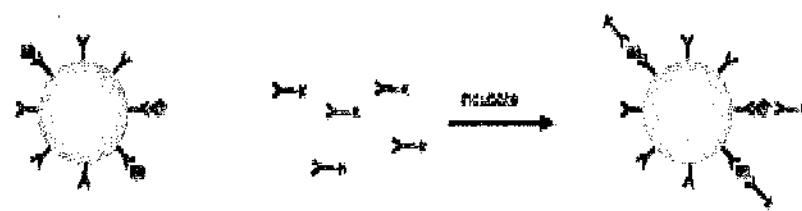
### 5.3 Kỹ thuật hóa phát quang (Chemiluminescent Magnetic Immunoassay - CMIA): sử dụng trên hệ thống máy miễn dịch tự động

**Nguyên lý:** dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KKT. Khi kết hợp với một thuốc thử kích hoạt, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ tạo ra ánh sáng.

B.1

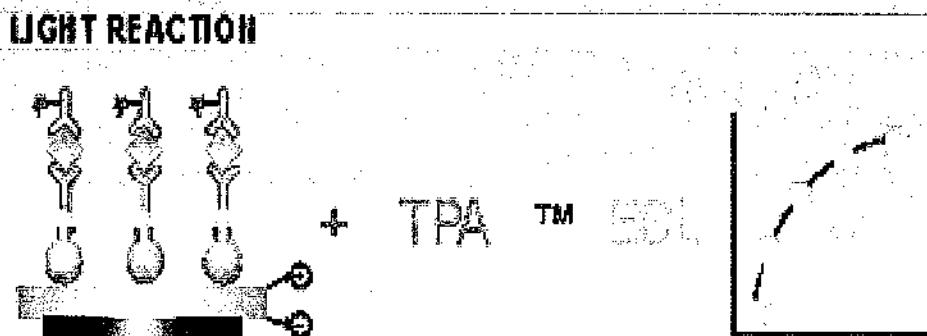


B.2



B.3 Thêm các dung dịch kích hoạt ánh sáng === tín hiệu phát quang

**Hình 6. Kỹ thuật hóa phát quang**



**Hình 7. Kỹ thuật điện hóa phát quang**

### 5.4. Kỹ thuật điện hóa phát quang (Electro Chemi Luminescene – ECL): sử dụng trên hệ thống máy miễn dịch tự động.

**Nguyên lý:** dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KKT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

### *5.5. Sắc ký miễn dịch*

Phức hợp KKT gắn chất màu được phân bố đều trên bản sắc ký. KN của vi sinh vật được gắn cố định tại “vùng phản ứng”. Khi nhỏ huyết thanh, KT đặc hiệu (nếu có) trong HT sẽ kết hợp với KKT gắn màu, phức hợp KT-KKT gắn màu này di chuyển trên giấy sắc ký sẽ bị giữ lại ở “vùng phản ứng” do KT kết hợp với KN vi sinh vật, kết quả “vùng phản ứng” hiện màu. Nếu trong HT không có KT đặc hiệu, KN không thể giữ được KKT gắn màu ở “vùng phản ứng”, vì vậy không hiện màu ở vùng này.

## **6. Nhận định kết quả các phản ứng kết hợp KN-KT**

Bất kỳ phản ứng kết hợp KN-KT nào cũng nhằm mục đích xác định KT hoặc KN, có thể là định tính hoặc định lượng.

### *6.1. Định tính*

Kết quả định tính chỉ cho biết trong mẫu xét nghiệm có hay không có KT hoặc KN. Có những trường hợp chỉ cần định tính đã có giá trị chẩn đoán. Đó là các trường hợp xác định những KN hoặc KT mà bình thường không có trong những mẫu xét nghiệm lấy từ những người khỏe mạnh. Ngược lại đối với những loại KN hoặc KT có thể tìm thấy cả ở những người bình thường thì chỉ định lượng mới có giá trị chẩn đoán.

### *6.2. Định lượng*

Để nhận định kết quả định lượng kháng thể trong chẩn đoán huyết thanh, cần phải đánh giá:

- Hiệu giá KT: hiệu giá KT là độ pha loãng HT lớn nhất mà phản ứng còn dương tính. Hiệu giá KT phản ánh nồng độ KT trong HT.
- Hiệu giá ranh giới (ngưỡng) giữa bình thường và bệnh lý. Vì trong rất nhiều trường hợp vi sinh vật gây bệnh là vi sinh vật thường trú cộng sinh. Việc xác định hiệu giá KT ở một thời điểm thường chưa đủ để có kết luận chắc chắn, cần phải tiến hành hai lần ở hai thời điểm cách nhau từ 7 đến 10 ngày để tìm động lực KT.
- Động lực KT là mức độ thay đổi hiệu giá KT theo thời gian. Động lực KT là thương số giữa hiệu giá KT lần thứ 2 và lần 1. Động lực KT ít nhất phải bằng

4 (tức là tăng 2 bậc khi HTđược pha loãng bậc 2) mới có giá trị chẩn đoán chắc chắn là bệnh nhân đang mắc bệnh nhiễm trùng.

- Hiện tượng dương tính giả và âm tính giả.

+ Dương tính giả: là hiện tượng trong mẫu huyết thanh không có sự hiện diện của KN hoặc KT cần tìm, nhưng xét nghiệm lại cho kết quả dương tính khi làm xét nghiệm.

+ Âm tính giả: Trong mẫu huyết thanh/ huyết tương có mặt KN hoặc KT cần tìm, nhưng xét nghiệm lại cho kết quả âm tính.

+ Cách khắc phục:

- Luôn tuân thủ đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Khi tiến hành phản ứng, bao giờ cũng phải có chứng âm và chứng dương đi kèm. Nếu chứng dương lại có kết quả âm tính, hoặc chứng âm lại có kết quả dương tính thì phải tiến hành làm lại xét nghiệm.
- Tuyệt đối không sử dụng sinh phẩm hóa chất đã hết hạn.

**Bài 5**  
**PHƯƠNG PHÁP LẤY, VẬN CHUYỂN VÀ BẢO QUẢN**  
**BỆNH PHẨM ĐỂ XÉT NGHIỆM VI SINH**

**Mục tiêu**

1. *Nêu được tầm quan trọng và quy định lấy bệnh phẩm xét nghiệm vi sinh.*
2. *Trình bày được nguyên tắc lấy, vận chuyển và bảo quản bệnh phẩm để xét nghiệm vi sinh.*
3. *Mô tả đúng các phương pháp lấy, vận chuyển và bảo quản các loại bệnh phẩm để xét nghiệm vi sinh.*

**1. Tầm quan trọng**

- Kết quả phân lập vi khuẩn không chỉ đơn thuần dựa vào các phương pháp nuôi cấy tại phòng xét nghiệm mà còn phụ thuộc vào kỹ thuật lấy bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản bệnh phẩm.
  - Lấy bệnh phẩm theo đúng quy định là bước đầu quan trọng nhất để khẳng định vi sinh vật được tìm thấy là tác nhân gây bệnh. Lấy bệnh phẩm không đúng phương pháp không những dẫn đến kết quả thiếu chính xác mà thậm chí còn có hại cho việc điều trị.

**2. Quy định chung**

- Tốt nhất là lấy bệnh phẩm trước khi sử dụng kháng sinh. Nếu đang sử dụng kháng sinh phải ngừng sử dụng trước 24 giờ.
- Lấy đúng vị trí bị nhiễm khuẩn, tránh nhiễm bẩn từ bên ngoài vào.
- Lấy đúng thời kỳ của bệnh, lúc vi khuẩn có mặt nhiều nhất tại vị trí lấy bệnh phẩm.
  - Lấy đủ số lượng bệnh phẩm cần thiết.
  - Lấy bệnh phẩm vào các dụng cụ thích hợp và vô trùng. Các dụng cụ này do phòng xét nghiệm cung cấp.
  - Bệnh phẩm phải có nhãn ghi họ tên bệnh nhân, tuổi, khoa - phòng, chất gửi xét nghiệm, ngày giờ lấy bệnh phẩm để tránh nhầm lẫn.

- Phiếu xét nghiệm phải có thông tin tối thiểu về tình hình bệnh như họ tên bệnh nhân, tuổi, khoa phòng, chất gửi xét nghiệm, chẩn đoán sơ bộ, yêu cầu xét nghiệm, ngày giờ lấy bệnh phẩm, người viết phiếu xét nghiệm.

### 3. Nguyên tắc chung

*Bệnh phẩm từ các vị trí vô trùng (máu, dịch não tuỷ, các chất dịch và mủ ổ kín...)*

- Lấy bệnh phẩm: Chú ý vô trùng, tránh nhiễm bẩn.
  - Vận chuyển: Càng sớm càng tốt, trong vòng 2 giờ. Nếu quá 6 giờ phải được bảo quản trong các môi trường bảo quản như Stuart's, Amies, Cary & Blair...
  - Bảo quản: tủ âm 37°C
- Bệnh phẩm từ các vị trí có vi sinh vật cư trú (đường hô hấp trên, nước tiểu giữa dòng, phân, mủ ngoài da, chất tiết sinh dục...)*
- Lấy bệnh phẩm: Đúng vị trí bị nhiễm trùng.
  - Vận chuyển: Càng sớm càng tốt, trong vòng 2 giờ. Nếu quá 6 giờ phải được bảo quản trong các môi trường bảo quản như Stuart's, Amies, Cary & Blair...
  - Bảo quản: Ngăn mát tủ lạnh (4 - 8°C).

### 4. Phương pháp lấy các loại bệnh phẩm

#### 4.1. Mẫu nước tiểu

##### 4.1.1. Phương pháp

*Lấy nước tiểu để tìm các vi khuẩn gây bệnh thông thường*

- Lấy nước tiểu giữa dòng đầu buổi sáng.
- Lấy nước tiểu qua ống thông.
- Lấy nước tiểu bằng cách chọc hút qua bàng quang trên xương mu.

*Phương pháp lấy nước tiểu giữa dòng đầu buổi sáng*

- Bệnh nhân nhịn tiểu suốt đêm, hoặc có thể để bệnh nhân nhịn tiểu trước đó 2 giờ.
- Rửa sạch bộ phận sinh dục ngoài bằng xà phòng.
- Đi tiểu vào một lọ miệng rộng đã vô khuẩn. Bỏ đoạn nước tiểu đầu, lấy

nước tiểu quãng giữa. Tuyệt đối không được lấy nước tiểu qua bô.

#### *Lấy nước tiểu để tìm trực khuẩn Lao (*Mycobacterium tuberculosis*)*

- Bệnh nhân nhịn tiểu từ 5 giờ chiều hôm trước và nhịn uống nước hoặc uống rất ít nước.
- Hoặc lấy nước tiểu 24 giờ.

#### *Lấy nước tiểu để tìm vi khuẩn Lậu (*Neisseria gonorrhoeae*)*

- Ngày hôm trước cho bệnh nhân uống nhiều bia, uống rượu, thức khuya.
- Ngày hôm sau lấy nước tiểu giữa dòng, đầu buổi sáng.
- Hoặc nhịn đi tiểu ít nhất là 3 giờ trước khi làm xét nghiệm.

#### *4.1.2. Vận chuyển và bảo quản*

- Nước tiểu lấy xong phải gửi ngay đến phòng xét nghiệm.
- Nếu chưa gửi bệnh phẩm phải bảo quản ở nhiệt độ 2 - 4°C, không được để quá 2 giờ.

#### *4.2. Dịch tiết đường sinh dục*

##### *4.2.1. Phương pháp*

###### *Lấy bệnh phẩm ở nam giới*

- Lấy mù ở niệu đạo vào buổi sáng trước khi đi tiểu bằng cách dùng tăm bông vô trùng đưa sâu vào niệu đạo 2 – 3 cm, xoay tròn và để tăm bông trong đó 5 giây rồi rút tăm bông ra.
- Lấy mù hoặc dịch tiết dàn lên phiến kính sạch và trong. Dàn đều và mỏng càng tốt. Nên dùng 2 que tăm bông, 1 để soi trực tiếp, 1 để nuôi cấy.
- Những bệnh nhân mạn tính phải lấy bệnh phẩm vào lúc sáng sớm hoặc lấy tinh trùng để nuôi cấy.
- Những bệnh nhân nghi ngờ là đồng tính luyến ái lấy ở hậu môn, huyền họng.

###### *Lấy bệnh phẩm ở nữ giới*

- Quan sát vị trí tổn thương: Dùng mỏ vịt đưa sâu vào âm đạo, xoay ngang và mở rộng mỏ vịt để nhìn thấy cổ tử cung.
- Bệnh phẩm chủ yếu được lấy ở niệu đạo và cổ tử cung, có thể lấy thêm ở hai tuyến Skene và hai tuyến Bartholin. Dùng que cấy hoặc tăm bông vô trùng đưa sâu vào cổ tử cung 2 - 3 cm, xoay tròn tăm bông và để trong đó 5 - 10 giây để cho dịch rỉ hoặc mù ngầm vào tăm bông.

### **Lấy dịch rỉ mắt ở trẻ sơ sinh**

- Dùng ngón cái và ngón trỏ có đi găng tay ẩn vào hai mí mắt trẻ sơ sinh để mủ ở kết mạc sẽ chảy ra.
- Dùng tăm bông vô trùng lấy mủ, chờ 5-10 giây để mủ ngấm vào tăm bông.

#### **4.2.2. Vận chuyển và bảo quản**

Các vi khuẩn gây viêm nhiễm đường sinh dục thường rất dễ chết. Tốt nhất việc lấy bệnh phẩm phải thực hiện tại phòng xét nghiệm hoặc phải để trong môi trường bảo quản.

### **4.3. Bệnh phẩm đường tiêu hóa**

#### **4.3.1. Dịch dạ dày**

Lấy lúc sáng sớm khi bệnh nhân chưa ăn, dùng ống thông dạ dày lấy dịch cho vào lọ vô trùng.

#### **4.3.2. Mảnh sinh thiết dạ dày-tá tràng**

Lấy qua đường nội soi, để chẩn đoán vi khuẩn (*H. pylori*) cần lấy 3 mảnh (2 mảnh ở rìa ổ loét, 1 mảnh ở hang vị). Bệnh phẩm có thể được đặt trong nước muối sinh lý hoặc môi trường vận chuyển chuyên biệt, đem đến phòng xét nghiệm trước 2 giờ.

#### **4.3.3. Chất nôn**

Lấy 5-10 ml cho vào lọ vô trùng đậm kín.

#### **4.3.4. Thức ăn**

Lấy chỗ thức ăn nghi ngờ xét nghiệm tìm vi khuẩn hoặc độc tố.

#### **4.3.5. Phân**

Tốt nhất lấy vào lúc bệnh nhân chưa dùng kháng sinh. Có thể lấy phân:

- Bằng tăm bông, ống thông.
- Qua bô.

#### **Lấy phân qua bô**

- Bô phải không có chất sát khuẩn và tráng bằng nước sôi để nguội.
- Chọn chỗ phân có biểu hiện bệnh lý nhày, máu, lợn cợn tráng...
- Dùng que tăm bông lấy một lượng phân 0,5 gam (bằng đốt ngón tay út).

#### **Vận chuyển và bảo quản**

- Gửi bệnh phẩm ngay đến phòng xét nghiệm trong vòng 2 giờ.

- Nếu gửi đi xa hoặc để quá 6 giờ phải cho vào môi trường bảo quản (Cary-Blair).
- Không được để bệnh phẩm khô nhất là mùa nóng.

#### *4.4. Bệnh phẩm đường hô hấp*

##### *4.4.1. Đờm*

- Chọc hút qua khí quản.
- Hút dịch phế quản.
- Khạc đờm.

##### *Phương pháp khạc đờm*

Tốt nhất là lấy đờm vào buổi sáng sớm khi bệnh nhân vừa ngủ dậy, sau khi đánh răng, súc miệng. Khạc đờm vào dụng cụ vô khuẩn miệng rộng.

Hướng dẫn bệnh nhân cách khạc đờm như sau:

- Hít thở 4 lần thật sâu (chú ý ngồi thẳng, không gấp người).
- Hai lần đầu hít hơi vào thật sâu, nín thở vài giây và thở ra chậm.
- Lần thứ ba hít hơi vào thật sâu, nín thở rồi tổng hết hơi ra miệng thật nhanh.
- Lần thứ tư hít hơi vào thật sâu và ho thật sâu.
- Bệnh nhân khạc đờm vào lọ đựng đờm.

Ghi rõ họ tên bệnh nhân và ngày lấy vào nhãn lọ.

Kiểm tra số lượng và chất lượng đờm, đờm của bệnh nhân thường có:

- Những dây chất nhày đặc có nhiều bọt không khí.
- Những mảnh sợi huyết nhỏ.
- Vài đám mủ nhỏ.
- Đôi khi có lẫn máu thành vệt màu nâu nhiều hay ít.

Việc thải trừ trực khuẩn lao trong đờm của bệnh nhân có tính chất chủ kỳ. Vì vậy, trong trường hợp nghi ngờ có lao phổi mà kết quả âm tính cần phải kiểm tra đờm 3 ngày liên tiếp.

##### *Đề nghị lấy lại bệnh phẩm*

Khi bệnh phẩm chỉ là dịch tiết của mũi, thanh quản, nước bọt là những bệnh phẩm không đạt yêu cầu.

#### *4.4.2. Ngoáy dịch tỳ hẫu*

Dùng que tăm bông mềm đưa qua đường mũi, khi tay có cảm giác que chạm nhẹ vào thành sau họng thì xoay tròn tăm bông theo hai chiều rồi rút ra.

#### *4.4.3. Ngoáy họng*

##### *Phương pháp*

Họng và đường hô hấp trên là nơi cư trú của rất nhiều loại vi khuẩn. Lấy bệnh phẩm họng rất dễ nhưng lấy chính xác, đúng vị trí tồn thương lại rất khó:

- Để bệnh nhân ngồi ngay ngắn, quay mặt ra nguồn ánh sáng. Tốt nhất là có đèn soi.

- Dùng đè lưỡi, ấn nhẹ lưỡi xuống trong khi bệnh nhân nói A.

- Đối với viêm họng ban đỏ, dùng que tăm bông vô trùng quét vào amidan (cột sau và cực trên) màn hầu và lưỡi gà. Tránh không chạm que tăm bông vào răng, miệng và lưỡi.

- Đối với viêm họng giả mạc: Dùng que tăm bông hoặc dùng kẹp để lấy màng giả vì giả mạc nhiều khi dai, dính rất khó lấy.

- Tốt nhất là lấy hai que tăm bông, 1 để soi trực tiếp, 1 để nuôi cấy.

##### *Vận chuyển và bảo quản*

Bệnh phẩm phải được gửi ngay đến phòng xét nghiệm. Nếu không phải giữ trong môi trường bảo quản.

#### *4.5. Bệnh phẩm cấy máu*

##### *4.5.1. Chỉ định*

- Lấy máu khi bệnh nhân đang rét run, sốt, đúng thời kỳ vi khuẩn đang lưu hành trong máu nhiều nhất (ví dụ: thương hàn cấy máu vào tuần lễ đầu của bệnh, lúc bệnh nhân đang sốt cao).

- Bảo đảm đúng kỹ thuật vô khuẩn khi cấy máu để tránh các trường hợp nhiễm bẩn do vi khuẩn ở da và không khí.

- Đảm bảo đúng khối lượng máu cần lấy. Tỷ lệ khối lượng máu trên khối lượng môi trường là 1/10.

- Có thể cấy máu nhiều lần trong một ngày hoặc nhiều ngày liên tiếp như đối với bệnh Osler (6 giờ 1 lần, 3 lần trong 1 ngày).

#### *4.5.2. Không nên chỉ định cấy máu*

- Khi bệnh nhân không sốt (trừ một số bệnh về tim như thaler). Nếu nhiệt độ dao động tốt nhất nên lấy máu lúc bệnh nhân sốt cao nhất.
- Khi bệnh nhân vừa ăn cơm xong (2-3 giờ sau mới nên cấy).
- Khi bệnh nhân đang ho hoặc vừa tiêm truyền huyết thanh hoặc truyền máu.
- Khi bệnh nhân đang sử dụng kháng sinh. Cấy máu trước khi sử dụng kháng sinh hoặc phải ngừng kháng sinh trước 24-48 giờ.

#### *4.5.3. Kỹ thuật lấy máu (bảo đảm đúng kỹ thuật vô khuẩn, tránh nhiễm bẩn)*

- Kiểm tra thân nhiệt của bệnh nhân.
- Chọn tĩnh mạch (không nên lấy máu qua catheter), buộc garô.
- Sát trùng da bằng cồn 70° iodine 2% (1 phút) hoặc providone iodine (2 phút).
- Để khô 1 - 2 phút.
- Lấy máu bằng bơm tiêm vô trùng.
- Thay kim rồi bơm máu vào bình canh thang trên lửa đèn cồn
- Tháo garo, sát trùng da lại.

#### *4.5.4. Chú ý*

- Máu sau khi cấy vào canh thang cần phải được ủ ấm ngay vào tủ ấm với nhiệt độ thích hợp, thông thường là 37°C.
- Sử dụng hai môi trường nuôi cấy: Khí trùng có O<sub>2</sub> và kỵ khí
- Số lượng máu lấy được, tỷ lệ máu so với môi trường nuôi cấy và sự có mặt của kháng sinh, tất cả đều có ý nghĩa quan trọng đối với sự mọc của vi khuẩn.

### *4.6. Bệnh phẩm dịch não tuỷ, các chất dịch (dịch màng phổi, dịch màng tim, dịch màng bụng, dịch khớp...)*

#### *4.6.1. Phương pháp*

- Nguyên tắc là phải đảm bảo vô khuẩn.
- Sát trùng da bằng cồn 70% và iốt 2%.
- Bệnh phẩm lấy ít nhất là 1 ml.

#### *4.6.2. Vận chuyển và bảo quản bệnh phẩm*

Bệnh phẩm sau khi lấy phải được gửi ngay đến phòng xét nghiệm vì các tác nhân gây bệnh, đặc biệt ở dịch não tuỷ rất dễ chết. Luôn giữ ở nhiệt độ 37°C (cặp vào nách) hoặc để tủ ấm. Tuyệt đối không được bảo quản trong tủ lạnh.

## **4.7. Bệnh phẩm mủ**

### **4.7.1. Đối với áp xe kín**

- Sát khuẩn da bằng cồn  $70^{\circ}$  + iốt 2%.
- Chọc hút bằng bơm tiêm vô khuẩn.
- Bơm mủ vào ống nghiệm vô khuẩn.
- Nếu hút được ít mủ thì gửi cả bơm tiêm cho vào ống nghiệm vô khuẩn
- Viêm hạch do trực khuẩn dịch hạch nhưng chưa hoá mủ thì có thể bơm 0,5 ml nước muối đắng trương vô khuẩn vào hạch rồi hút lại. Chú ý đưa mũi kim vào nhiều hướng để hút được vi khuẩn.

### **4.7.2. Đối với áp xe vỡ**

- Nếu nhiều mủ thì hút bằng bơm tiêm vô trùng hoặc lấy bằng tăm bông
- Nếu ít mủ thì sát trùng da rồi dùng tăm bông chấm vào mủ
- Tồn thương có vảy, phải làm bong rồi lấy mủ

### **4.7.3. Vận chuyển và bảo quản bệnh phẩm**

Mủ hút trong bơm tiêm hay tăm bông cần phải gửi tới phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt. Vì khuẩn ở tăm bông dễ chết và bởi vì vi khuẩn sống sót phụ thuộc vào một số yếu tố như số lượng vi khuẩn có trong mẫu bệnh phẩm, số lượng bệnh phẩm nhiều tốt hơn.

## **4.8. Lấy máu tìm kháng nguyên hoặc kháng thể**

### **4.8.1. Lấy bệnh phẩm**

#### **Lấy máu tĩnh mạch**

Tùy theo từng phương pháp mà lấy số lượng máu thích hợp, thường lấy 3ml máu cho vào ống nghiệm không có chất chống đông. Để máu đông, ly tâm chắt lấy phần huyết thanh.

#### **Xác định động lực kháng thể**

Động lực kháng thể là sự gia tăng hiệu giá kháng thể lần 2 so với lần 1, ít nhất là gấp 2 lần. Khi có động lực kháng thể thì có thể kết luận người bệnh bị nhiễm khuẩn.

Nên lấy máu 2 lần, lần thứ nhất vào những ngày đầu của bệnh, lần thứ hai sau lần thứ nhất từ 7 đến 10 ngày để xác định động lực kháng thể. Huyết thanh bệnh nhân được pha loãng nhiều nồng độ khác nhau, thường giảm dần

theo bậc 2: Hai mẫu huyết thanh 1 và 2 cùng được tiến hành làm phản ứng trong cùng một điều kiện (huyết thanh kép). So sánh hiệu giá kháng thể của hai mẫu huyết thanh lần 1 và lần 2 để tìm động lực kháng thể.

#### *Xác định hiệu giá kháng thể*

Hiệu giá kháng thể được tính là nồng độ huyết thanh được pha loãng nhất mà ở đó phản ứng kết hợp kháng nguyên kháng thể còn xảy ra dương tính.

#### *4.8.2. Vận chuyển và bảo quản*

Trong trường hợp không gửi được ngay đến phòng xét nghiệm thì không giữ máu toàn phần mà phải ly tâm chất giữ lại phần huyết thanh và bảo quản ở 20°C hoặc ngăn đá của tủ lạnh.

#### *4.9. Lấy bệnh phẩm để nuôi cấy vi khuẩn ký khí*

##### *4.9.1. Lấy bệnh phẩm*

- Dùng bơm tiêm vô trùng chọc hút mủ thường là mủ ở các ổ áp xe ở sâu. Đối với bệnh phẩm mủ và các chất dịch viêm nên chọc hút bằng bơm tiêm nhựa vô trùng. Hút càng nhiều càng tốt. Đậy chặt kim lại bằng chính nắp đậy của bơm tiêm.

- Nếu lấy bệnh phẩm vào ống nghiệm thì phải lấy gần đầy, chỉ để ít khoảng không, đậy chặt nắp.

- Đối với hoại thư sinh hơi nên cắt phần cơ nằm giữa tổ chức hoại tử và tổ chức lành, không lấy phần tổ chức đã bị hoại tử hoàn toàn.

- Hắn hưu do mủ quá ít, có thể lấy bằng tăm bông (dịch âm đạo).

*Chú ý:* Bác sĩ lâm sàng nên gọi điện báo trước cho phòng xét nghiệm để bảo đảm bệnh phẩm không tiếp xúc ra ngoài không khí quá 15 phút.

##### *4.9.2. Vận chuyển và bảo quản*

- Chuyển ngay bệnh phẩm đến phòng xét nghiệm.
- Tốt nhất là đảm bảo từ lúc lấy bệnh phẩm đến khi nuôi cấy không quá 15 phút.
- Khi lấy bệnh phẩm cần bơm bỏ phần mủ ở đầu kim hoặc lấy mủ sâu ở phần dưới ống nghiệm.

## CHƯƠNG II

# CÁC KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM CƠ BẢN

### Bài 6

## CÁC PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG, TIỆT TRÙNG TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

#### Mục tiêu

1. *Nêu được một số khái niệm về tiệt trùng và khử trùng.*
2. *Trình bày được kỹ thuật tiệt trùng.*
3. *Trình bày được kỹ thuật khử trùng.*

#### 1. Một số khái niệm

- Tiệt trùng (sterilization) là các biện pháp loại bỏ hoàn toàn hoặc phá huỷ mọi dạng sống của vi sinh vật. Quá trình này được thực hiện bằng phương pháp hoá học hoặc lý học, bằng nhiệt khô, nhiệt ướt hoặc khí ethylene oxide (EO). Khi hoá chất được sử dụng cho mục đích phá huỷ mọi dạng sống của vi sinh vật bao gồm cả nha bào và nấm thì hoá chất đó được gọi là chất tiệt khuẩn. Nếu cũng các hoá chất đó được sử dụng trong khoảng thời gian tiếp xúc ngắn hơn thì nó là chất khử trùng.

- Khử trùng (decontamination) là quá trình loại bỏ gần hoàn toàn hoặc hoàn toàn vi sinh vật, trừ các dạng nha bào bằng cách ngâm dụng cụ vào trong dung dịch hoá chất hoặc bằng phương pháp Pasteur. Theo định nghĩa khử trùng không giống tiệt trùng ở chỗ nó không diệt được nha bào. Tuy nhiên, một số chất khử trùng mới vẫn có thể diệt được nha bào nếu thời gian tiếp xúc đủ lâu (6 - 10 giờ). Như vậy, sản phẩm này được gọi là chất tiệt trùng.

- Vô trùng (aseptic) là một quá trình ngăn chặn hay dự phòng sự xâm phạm của vi sinh vật đến các dụng cụ chuyên môn, túi phỏng mổ, buồng tiêm, buồng thay băng, buồng pha chế thuốc hoặc vết thương, vết mổ...

- Tẩy uế (disinfection) là các biện pháp dùng hoá chất nhằm phá huỷ vi sinh vật có trên các dụng cụ, làm cho các dụng cụ đó trở nên an toàn khi xử lý chúng.

- Sát trùng (antiseptic) là dùng các hoá chất để phá huỷ vi sinh vật, nhưng thực hiện trên tổ chức sống (trên da, răng, miệng) và trên các dụng cụ. Các hoá chất này tương đối ít độc hơn chất dùng để tẩy uế.

- Làm sạch là quá trình loại bỏ hoàn toàn các chất ngoại lai ra khỏi dụng cụ, thường được thực hiện bằng nước và xà phòng. Làm sạch được thực hiện trước mọi quá trình khử trùng và tiệt khuẩn.

## 2. Kỹ thuật tiệt trùng

### 2.1. Khí nóng khô (Tủ sấy)

#### 2.1.1. Chỉ định

Dùng để tiệt trùng các dụng cụ mà không thể cháy được, thường là dụng cụ thuỷ tinh như ống nghiệm, ống hút, hộp lồng petri...

#### 2.1.2. Nguyên lý

Ở  $170^{\circ}\text{C}$  -  $180^{\circ}\text{C}$ /1 giờ hoặc  $160^{\circ}\text{C}$ /2 giờ tất cả các vi khuẩn và nha bào đều bị diệt.

#### 2.1.3. Thời hạn sử dụng sau khi sấy khô

Dụng cụ sấy vô trùng có thể dùng trong 7 ngày. Khi để quá thời gian phải sấy lại.

#### 2.1.4. Bảo quản tủ sấy

Lau chùi thường xuyên 1 tuần /1 lần

### 2.2. Nhiệt ướt dưới áp lực cao (dùng lò hấp ướt Autoclave)

#### 2.2.1. Chỉ định

Đây là phương pháp khử trùng rất tốt và thường được dùng tại các bệnh viện, các phòng thí nghiệm và các cơ sở y tế để khử trùng dụng cụ kim loại, cao su, nhựa, băng gạc, môi trường, hoá chất...

#### 2.2.2. Nguyên lý

Trong một lò kín không có không khí, chỉ có hơi nước, khi áp lực hơi nước tăng thì nhiệt độ cũng tăng theo một tương quan nhất định. Khi nhiệt độ duy trì ở  $110$  -  $121^{\circ}\text{C}$ / 30 phút, tương ứng với áp lực 1 - 1,2 atmopthe các vi khuẩn và nha bào đều bị diệt.

### 2.2.3. Hạn sử dụng sau khi hấp ướt

Dụng cụ hấp ướt chỉ dùng trong 3 ngày. Môi trường trong bình kín hoặc ống nghiệm có thể giữ được một tuần.

## 2.3. Tia Gamma

### 2.3.1. Chỉ định

Tiết trùng các dụng cụ bông băng trong các túi đóng sẵn, chỉ katgut, catheter.

### 2.3.2. Nguyên lý

Bức xạ ion hoá giàu năng lượng có thể giết chết vi sinh vật.

## 2.4. Ethylenoxid và formaldehyd

### 2.4.1. Chỉ định

Ethylenoxid là một chất độc, gây dị ứng, kích thích niêm mạc mạnh và dễ cháy, ngoài ra nó còn là chất gây ung thư. Khi sử dụng phải hết sức thận trọng.

### 2.4.2. Nguyên lý

Dựa trên phản ứng hoá học, nhờ hoạt tính của nguyên tử oxy trong cấu tạo phân tử của ethylenoxid ( $\text{CH}_2\text{OCH}_2$ ).

## 2.5. Tanh-dan (Tyndan)

Đun cách thuỷ  $<100^\circ\text{C}$  3 lần liên tiếp cách nhau 12 - 24 giờ, mỗi lần 15 - 50 phút. Dùng tiệt trùng ở những chất dễ bị hỏng hoặc giảm chất lượng ở  $100^\circ\text{C}$ .

## 2.6. Lọc vô trùng

Dùng cho vacxin, huyết thanh và các dung dịch nhạy cảm nhiệt độ.

## 3. Kỹ thuật khử trùng

### 3.1. Biện pháp vật lý

#### 3.1.1. Hơi nước nóng (luộc sôi)

- Chỉ định: Khử trùng bơm kim tiêm, dụng cụ tiểu phẫu thuật. Khử trùng quần áo, chăn màn, các dụng cụ đã dùng của người bệnh.

- Nguyên lý: Hơi nước nóng  $80-100^\circ\text{C}$  có thể giết được các tế bào sinh trưởng ở trạng thái tự do trong vài phút. Khử trùng bằng cách đun sôi ở  $100^\circ\text{C}/30$  phút.

#### 3.1.2. Đốt

- Lò đốt nhỏ để đốt xác động vật thí nghiệm, bông gạc bẩn.
- Cồn đốt các dụng cụ tiêm phẫu thuật.
- Đèn cồn, đèn gaz khử trùng miệng ống nghiệm, đầu que cây.

### *3.1.3. Tia cực tím (U.V)*

- Chỉ định: khử trùng không khí phòng mổ, phòng vô trùng, nước. Tia cực tím có thể gây viêm kết mạc và giác mạc.
- Nguyên lý: tia cực tím (U.V) bước sóng 13,6 - 400nm, nhất là 257nm, có tác dụng khử trùng. Liều 100 - 500 Wsec/cm<sup>2</sup> diệt được 90% các loài vi khuẩn, không diệt được nha bào và bào tử nấm.
- Cơ chế tác dụng: cấu trúc các phân tử của vi sinh vật như acid nucleic bị biến đổi khi hấp thụ bức xạ này, dẫn đến đột biến làm hỏng chất liệu di truyền và chết.

## *3.2. Biện pháp hoá học*

### *3.2.1. Cồn*

- Cồn không diệt được nha bào. Tác dụng với virus còn có nhiều ý kiến khác nhau. Thường dùng dung dịch ethanol 80%, iopropanol 70% và propanol 60% để khử trùng da, bàn tay trong phẫu thuật và vệ sinh phòng bệnh. Những dung dịch đặc hơn do hút nước trong tế bào ra mạnh nên hiệu quả kém hơn.
- Ưu điểm là thời gian tác dụng ngắn, có khả năng thâm vào da kể cả lỗ chân lông và tuyến mồ hôi. Nhược điểm là bay hơi nhanh và dễ cháy.

### *3.2.2. Phenol và các dẫn xuất của phenol*

- Thường dùng dung dịch phenol 0,5-4%.
- Không diệt được nha bào và virus nhưng vững bền so với các chất sát khuẩn khác.
  - Phenol có thể ăn mòn da, niêm mạc và gây độc thần kinh.

### *3.2.3. Nhóm Halogen*

Phản ứng oxy hoá xảy ra nhanh và không quay trở lại. Halogen hoá chậm hơn, không mạnh bằng. Những phản ứng này xảy ra với nhiều chất hữu cơ khác nhau, sẽ làm giảm hoạt tính sát khuẩn trong những dung dịch có nhiều chất bẩn hữu cơ hay các chất oxy hoá và halogen hoá khác, nhất là amoniac.

Halogen có phô tác dụng rộng và tác dụng trong thời gian ngắn. Nhược điểm là phản ứng không đặc hiệu xảy ra rất nhanh với nhiều chất hữu cơ khác nhau, hiệu quả khử trùng kém khi vật khử trùng dính nhiều đờm, mủ... Khí clo có tính độc, có thể dị ứng với iốt.

- Clo để thanh khuẩn nước ăn.
- Clorua vôi khử trùng chất nôn, chất thải.
- Chloramin tinh kiết 1% để khử trùng bàn tay trong 5 phút.
- Chloramin 1% để khử trùng dụng cụ phải ngâm trong 20 phút.
- Chloramin 1,5-2,5% để khử trùng đồ vải và tẩy uế trong 2-12 giờ.
- Dung dịch iốt (betadin) và dung dịch cồn iốt 7%, KI 3%, cồn 90<sup>0</sup> được sử dụng nhiều để sát trùng da.

#### 3.2.4. Muối kim loại nặng

- Tác dụng chế khuẩn, không diệt được nha bào, virus và khả năng diệt các vi khuẩn kháng acid yếu.
- Phenol borat thuỷ ngân để sát trùng vết thương, da và niêm mạc.
- Thuốc nhỏ mắt Argerol có muối bạc.

#### 3.2.5. Aldehyd

- Quan trọng nhất là Formaldehyd (Formon) dung dịch 0,5-5,0% và khí 5g/cm<sup>3</sup>.
- Tác dụng tiêu diệt vi khuẩn, nấm và virus. Nếu đủ thời gian và nhiệt độ cao còn diệt được cả nha bào.
- Formaldehyd kích thích da và niêm mạc, có thể dẫn tới dị ứng và gây ung thư.
  - + Dung dịch nước để lau chùi sàn nhà và đồ dùng.
  - + Khí dùng để khử trùng không khí và máy móc lớn.

#### 3.2.6. Các chất oxy hoá

Oxy già ( $H_2O_2$ ), thuốc tím ( $KMnO_4$ ) và xanh methylen được pha thành dung dịch lỏng, dùng làm chất sát khuẩn bôi ngoài da.

#### 3.2.7. Acid và bazơ

Acid và bazơ có tác dụng diệt khuẩn vì tính điện phân thành  $H^+$  và  $OH^-$ .

Bài 7

**HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN  
KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC**

**Mục tiêu**

1. *Trình bày được cấu tạo của kính hiển vi quang học.*
2. *Trình bày được các bước sử dụng kính hiển vi quang học với vật kính thường và vật kính dầu.*
3. *Trình bày được các bước bảo quản và bảo dưỡng kính hiển vi.*

**1. Định nghĩa**

Kính hiển vi quang học là một thiết bị sử dụng ánh sáng để quan sát những vật thể có kích thước nhỏ nhờ một hệ thống gồm nhiều thấu kính thuỷ tinh được ghép với nhau.

**2. Mục đích**

Kính hiển vi quang học là một thiết bị dùng để quan sát: hình dạng, kích thước, khả năng bắt màu của tế bào, vi khuẩn và ký sinh trùng.

**3. Cấu tạo**

**3.1. Phản quang học**

**3.1.1. Nguồn sáng**

- Có thể là gương nếu dùng ánh sáng tự nhiên hoặc là dùng ở ngoài.
- Là đèn Halogen gắn vào trong đế kính hiển vi. Hiện nay kính hiển vi chủ yếu dùng nguồn sáng loại này.

**3.1.2. Tụ quang**

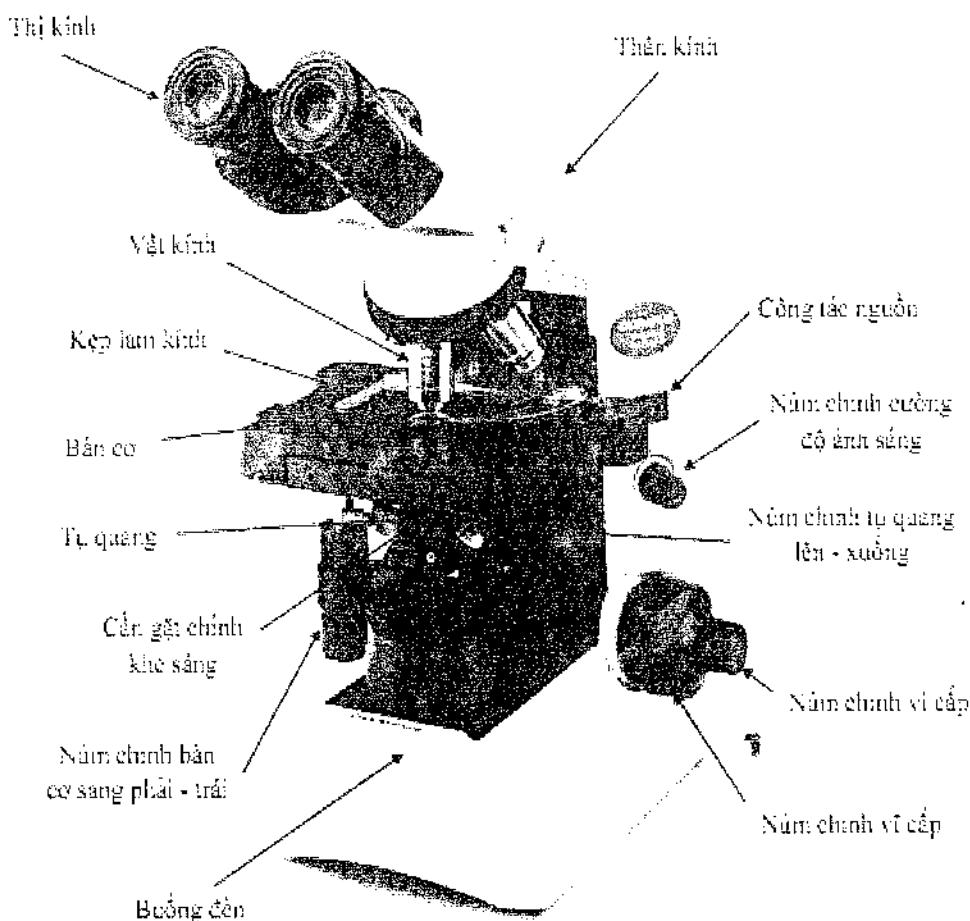
Là hệ thống thấu kính để tập trung ánh sáng, có hai loại: tụ quang thường và tụ quang nền đen.

**3.1.3. Vật kính**

Vật kính là nơi thu nhận hình ảnh từ tiêu bản. Gồm có hai loại:

- Vật kính thường: có độ phóng đại nhỏ, được ký hiệu 4X, 10X, 40X (20X, 60X).

- Vật kính dày: có độ phóng đại lớn 90X, 100X, 150X khi soi cần phải có dày soi. Kính hiển vi hiện nay chủ yếu sử dụng vật kính 100X.



**Hình 8. Cấu tạo kính hiển vi**

#### 3.1.4. Thị kính

Thị kính là nơi ta đặt mắt vào để quan sát tiêu bản. Có loại KHV chỉ có một mắt, có loại hai mắt. Độ phóng đại của thị kính cũng có nhiều loại 4X, 6X, 7X, 8X, 10X, 15X. Nhưng hay gặp nhất là loại thị kính 10X.

#### 3.1.5. Độ phóng đại của vật qua kính hiển vi

Độ phóng đại bằng tích độ phóng đại của thị kính nhân với độ phóng đại của vật kính.

Ví dụ: Độ phóng đại của vật qua kính khi sử dụng thị kính 10X, vật kính 100X là:  $100 \times 10 = 1000$  lần.

### *3.2. Phần cơ học*

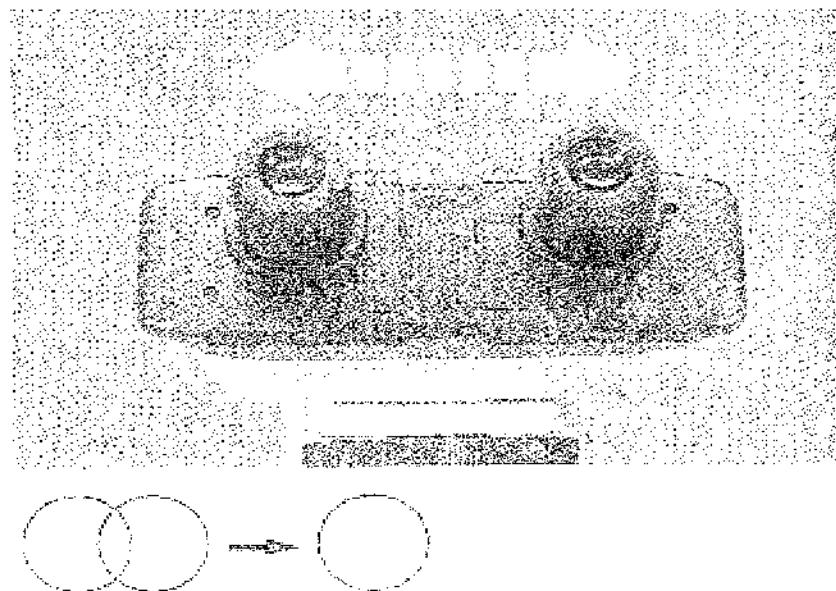
Bộ phận giữ (thân kính) và điều chỉnh bộ phận quang học (Núm điều chỉnh cường độ ánh sáng, cần gạt khe sáng, núm chỉnh vi cấp và vĩ cấp). Đáng chú ý là hệ thống trượt (bàn cơ, núm điều chỉnh bàn cơ, kẹp lam, núm điều chỉnh tụ quang lên xuống), tùy theo kính hiển vi khác nhau mà có hệ thống trượt khác nhau.

Trong đó quan trọng nhất là hệ thống vi cấp và vĩ cấp, chúng có cấu tạo rất phức tạp và tinh vi như hệ thống bánh xe trong đồng hồ, sử dụng không cẩn thận có thể hỏng.

## **4. Hướng dẫn sử dụng kính hiển vi**

### *4.1. Điều chỉnh khoảng cách giữa hai thị kính*

Điều chỉnh sao cho vi trường nhìn bên mắt trái và mắt phải trùng khít vào nhau bằng cách thu ngắn hoặc kéo dài khoảng cách giữa hai thị kính.

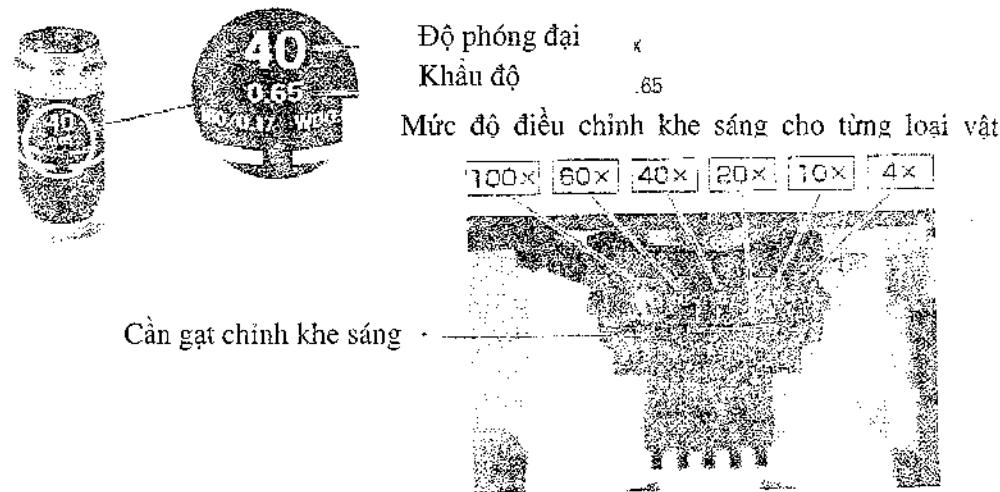


*Hình 9. Điều chỉnh khoảng cách giữa hai thị kính*

### *4.2. Điều chỉnh màng chắn khe sáng*

- Điều chỉnh cho phù hợp với loại vật kính đã chọn để đạt được độ rõ nét và độ tương phản tốt nhất. Thông thường, hình ảnh tốt và đủ độ tương phản khi đóng khe chắn sáng 70-80% giá trị khẩu độ số của vật kính. Khi đó ta sẽ gạt cần chỉnh khe chắn sáng tới đúng giá trị của vật kính cần đang dùng.

- Mỗi một vật kính có độ phóng đại nhất định, tương ứng với vật kính đó là một giá trị khẩu độ số. Ví dụ: trên vật kính có ghi  $40X/0.65$  có nghĩa độ phóng đại là  $40X$  và khẩu độ số là  $0.65$ .



**Hình 10.** Mức độ điều chỉnh khe sáng cho từng loại vật kính

Chú ý: mỗi lần điều chỉnh độ phóng đại của vật kính cần điều chỉnh lại khe sáng cho phù hợp với vật kính.

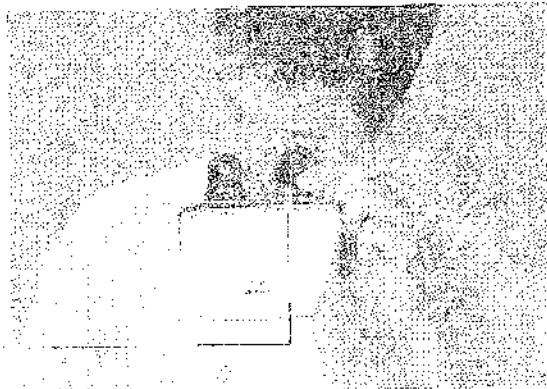
#### 4.3. Điều chỉnh đì ốp của thị kính

- Đưa vật kính  $4X$  vào đường quang. Dùng núm chỉnh vi cấp và vĩ cấp để cho ảnh rõ nét của tiêu bản.
- Đưa vật kính  $10X$  vào đường quang. Dùng mắt phải nhìn vào thị kính bên phải trong khi quay vòng điều chỉnh đì ốp của thị kính bên phải cho đến khi hình ảnh rõ nét.



**Hình 11.** Điều chỉnh đì ốp của thị kính

- Nhìn mắt phải vào thị kính bên trái trong khi quay vòng điều chỉnh đì ốp của thị kính bên trái cho đến khi hình ảnh rõ nét.



*Hình 12: Điều chỉnh đi óp của thị kính*

#### *4.3.1. Cách sử dụng kính hiển vi với vật kính thường*

- (1). Bật công tắc đèn.
- (2). Điều chỉnh khoảng cách thị kính.
- (3). Đặt tiêu bản lên bàn cơ và dùng kẹp lam để giữ cố định.
- (4). Dùng núm chỉnh vĩ cấp đưa bàn cơ lên vị trí cao nhất.
- (5). Dùng vật kính 4X hoặc 10X để lấy tiêu cự: Xoay vật kính vào vị trí hoạt động (xoay vật kính khi nghe thấy tiếng “kych” là vật kính đã vào đúng vị trí hoạt động). Giảm cường độ ánh sáng và chỉnh khe sáng. Dùng núm vĩ cấp hạ từ từ bàn cơ xuống, khi thấy loá hình tiêu bản thì dừng lại. Sử dụng núm vi cấp để điều chỉnh tiêu bản cho rõ nét. Nếu không thấy tiêu bản phải làm lại từ đầu.
- (6). Quan sát bằng vật kính 40X: Sau khi lấy được tiêu cự ở bước (5), chuyển vật kính sang 40X, điều chỉnh lại khe sáng và điều chỉnh núm vĩ cấp, vi cấp cho đến khi quan sát được hình ảnh rõ nét.
- (7). Khi quan sát tiêu bản có thể dùng núm điều chỉnh bàn cơ sang trái, phải để quan sát khu vực khác nhau của tiêu bản.
- (8). Quan sát xong, hạ bàn cơ, lấy tiêu bản ra khỏi bàn cơ, tắt đèn và xoay vật kính về vị trí nghỉ.

#### *4.3.2. Cách sử dụng kính hiển vi với vật kính dầu*

- (1). Bật công tắc đèn.
- (2). Điều chỉnh khoảng cách giữa hai thị kính.
- (3). Đặt tiêu bản lên bàn cơ và dùng kẹp lam để giữ cố định.
- (4). Dùng núm chỉnh vĩ cấp đưa bàn cơ lên vị trí cao nhất.
- (5). Dùng vật kính 10X để lấy tiêu cự.

- (6). Nhỏ dầu soi lên trên mặt tiêu bản.
- (7). Quan sát bằng vật kính dầu: Chuyển sang vật kính 100X. Tăng cường độ ánh sáng và mở hết khe sáng. Điều chỉnh núm vĩ cấp và vi cấp cho đến khi quan sát được hình ảnh rõ nét.
- (8). Khi quan sát tiêu bản có thể dùng núm điều chỉnh bàn cơ sang trái, phải để quan sát khu vực khác nhau của tiêu bản.
- (9). Quan sát xong, hạ bàn cơ, lấy tiêu bản ra khỏi bàn cơ, tắt đèn, lau khô vật kính và xoay về vị trí nghỉ.

## 5. Bảo quản và bảo dưỡng kính hiển vi

### 5.1. Bảo quản bộ phận quang học

- Đối với các bộ phận quang học: Dùng giấy lau kính hoặc mành vải mềm đã được thấm hỗn hợp cồn tuyệt đối và eter (theo tỷ lệ cồn:eter = 3:7). Trong trường hợp không có hỗn hợp trên ta có thể chỉ cần sử dụng cồn tuyệt đối.

- Riêng đối với vật kính dầu: Dùng giấy lau kính hoặc tấm vải mềm đã được thấm benzin hoặc cồn tuyệt đối để lau (3 - 4 lần).

### 5.2. Vệ sinh kính hiển vi

- Tránh sử dụng các loại dung dịch hữu cơ như là: cồn, chất pha loãng hoặc các chất tương tự để lau kính hiển vi. Vì khi sử dụng các chất này sẽ làm bay màu sơn hoặc các phần làm bằng nhựa hoặc bay mất các chữ số in trên thân máy.

- Nên sử dụng miếng vải có tẩm chất silicon để lau các bộ phận sơn hoặc các bộ phận bằng nhựa trong kính hiển vi.

- Đối với các vết bẩn khó lau sạch hoặc bám quá chặt thì nên sử dụng một miếng gạc được thấm một ít nước pha với loại chất tẩy rửa nhẹ (hoạt tính nhẹ).

### 5.3. Bảo quản kính hiển vi

- Khi không sử dụng kính hiển vi thì cần sử dụng áo kính để che bụi cho kính và cất giữ ở nơi khô ráo, thoáng khí. Vì móc rất ít khi sống ở nơi khô ráo.

- Phải đảm bảo rằng trước khi cất giữ thì công tắc nguồn điện phải ở trạng thái tắt và bóng đèn không nóng (có thể chạm tay được vào) thì mới được phủ áo kính.

### 5.4. Bảo trì bảo dưỡng

Để đảm bảo kính hiển vi hoạt động ổn định thì cần phải tiến hành công việc kiểm tra và bảo trì bảo dưỡng định kỳ, tốt nhất 6 tháng/1lần.

## Bài 8

# SỬ DỤNG, BẢO QUẢN MỘT SỐ MÁY MÓC TRANG THIẾT BỊ PHÒNG XÉT NGHIỆM

### Mục tiêu

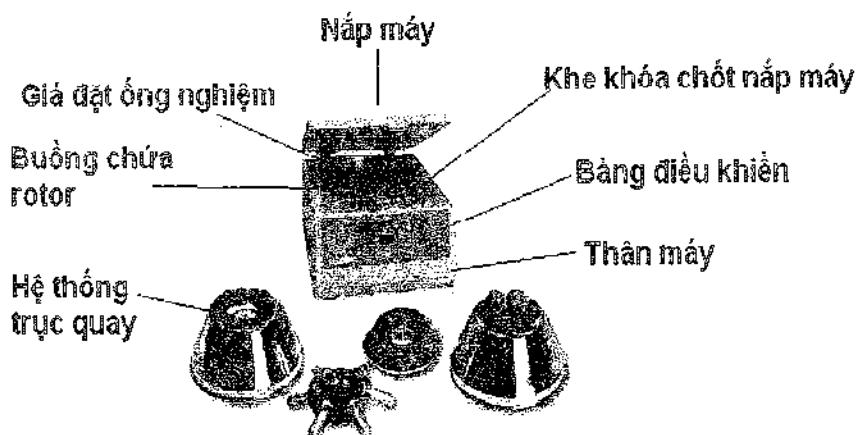
1. Trình bày được các bước của quá trình vận hành một số máy móc phòng xét nghiệm (máy ly tâm, tủ lạnh bảo quản sinh phẩm).
2. Thực hiện được các bước vận hành và bảo dưỡng máy ly tâm và tủ lạnh.
3. Nhận được các nguyên nhân và cách khắc phục sự cố khi vận hành máy ly tâm và tủ lạnh.

### 1. Máy ly tâm

#### 1.1. Khái niệm

Ly tâm là một quá trình được sử dụng để tách hoặc cô đặc các phần tử lơ lửng trong môi trường chất lỏng. Cơ sở lý thuyết của công nghệ này dựa vào tác động của trọng lực lên các phần tử lơ lửng trong chất lỏng, phần tử có khối lượng, kích thước các hạt và mật độ khác nhau sẽ lắng ở những tốc độ khác nhau tương ứng với trọng lượng của chúng. Lực ly tâm được sử dụng để tách các phần tử trong dung dịch và tăng tốc độ lắng bằng một thiết bị được gọi là máy ly tâm.

#### 1.2. Cấu tạo chung máy ly tâm



Hình 13. Cấu tạo chung máy ly tâm

Cấu tạo máy ly tâm gồm những bộ phận chính sau:

- Nắp máy
- Khe khoá chốt nắp máy
- Bảng điều khiển
- Thân máy
- Hệ thống trực quay
- Buồng chứa rotor
- Giá đặt ống nghiệm (rotor)

### 1.3. Quy trình vận hành- bảo dưỡng máy ly tâm

#### 1.3.1. Quy trình vận hành

##### 1.3.1.1. Chuẩn bị

- Chuẩn bị các mẫu xét nghiệm:
  - + Mẫu đưa vào ly tâm phải được bảo quản cẩn thận, đúng yêu cầu. Đối với mẫu máu không để máu đông thành cục;
  - + Mẫu phải được nạp đầy vào ống ly tâm trước khi đặt vào rotor trong buồng ly tâm.
- Ống ly tâm phải đặt đối xứng với nhau và cân bằng về trọng lượng.
- Rotor phải được làm sạch trước khi đưa vào buồng ly tâm.
- Cấp nguồn điện thích hợp cho máy.

##### 1.3.1.2. Các bước chạy máy

- Đóng nắp máy nghe thấy tiếng "tách" chứng tỏ nắp máy đã được đóng chắc chắn.

- Chọn chế độ làm việc: Đặt thời gian máy chạy hoặc cho máy chạy không định thời gian. Đối với quá trình ly tâm có hai thông số quan trọng nhất là tốc độ và thời gian, hai thông số này được đặt từ ban đầu và có thể điều chỉnh trong suốt quá trình vận hành.

- Án công tắc nguồn cho máy chạy.
- Điều chỉnh tốc độ động cơ tăng dần đến giá trị đặt.
- Theo dõi tình trạng máy hoạt động

##### 1.3.1.3. Dừng máy

- Khi hết thời gian chạy máy, đồng hồ thời gian cắt điện, động cơ chỉ còn

chạy theo quán tính.

- Phanh dừng động cơ.
- Án công tắc mở nắp máy khi đèn chỉ thị mở nắp sáng.
- Mở nắp máy bằng tay.
- Tắt điện.
- Lấy mẫu xét nghiệm ra khỏi máy.
- Đậy nắp máy kết thúc một lần xét nghiệm.

#### 1.3.1.4. Trường hợp khẩn cấp

- Nắp máy có thể không được mở trong khi mất điện. Quá trình mở nắp máy khi mất điện cung cấp cho máy được thực hiện bằng tay:

- + Để mở nắp khẩn cấp, rút phích cắm điện của máy ly tâm ra khỏi ổ cắm;
- + Khi rotor đứng yên mới được mở nắp.
- + Sử dụng chốt nhả khoá gắn ở đáy hoặc sườn của máy ly tâm để mở chốt khoá nắp máy:
  - Lật mặt sau của tẩm đậy máy;
  - Chèn chốt ngắt điện theo phương ngang vào lỗ cắm. Kéo chốt mở khoá vào cho đến khi tay cầm có thể được nâng lên khi chốt án xuống.
  - Mở nắp máy.

#### 1.3.1.5. Chế độ ngừng hoạt động

- Chế độ chờ: khi máy ly tâm không hoạt động trong thời gian ngắn có thể đặt chúng ở chế độ Stand by. Khi đó máy phải được làm lạnh nhanh đến nhiệt độ cần thiết, nhiệt độ này hiển thị trên màn hình khi đó rotor đứng yên và nắp đáy đóng.

- Chế độ tắt máy: khi máy không sử dụng trong thời gian dài nên tắt máy hoàn toàn và ngắt nguồn cung cấp cho máy.

### 1.4. Bảo dưỡng máy

#### 1.4.1. Công việc hàng ngày

- Vệ sinh máy: lau sạch vỏ máy, buồng chứa rotor, các rotor và các rotor phụ của máy ly tâm bằng chất làm sạch trung tính, không để ướt. Sau đó dùng nước ám để lau chùi lại máy. Chú ý: nếu sử dụng clorua để lau sạch buồng chứa thì phải rửa nhẹ nhàng buồng chứa một cách kỹ lưỡng bằng nước để loại

bỏ hoàn toàn chất tẩy rửa có clorua.

- Buồng chứa rotor cần phải được xả đá và làm sạch định kỳ để duy trì khả năng làm mát.

- Sâu mỗi lần vận hành phải kiểm tra xem trong buồng máy có ống nghiệm bị vỡ không, nếu có thì lấy hết các miếng thuỷ tinh vỡ ra, nếu có thể dùng máy hút để hút sạch các miếng thuỷ tinh vỡ nhỏ. Nếu có nước dịch chảy ra ngoài cần phải lau chùi sạch sẽ như đã hướng dẫn ở phần trên.

- Kiểm tra:

+ Giá đặt ống nghiệm xem chuyển động có nhẹ nhàng không, tra dầu nếu cần thiết;

+ Khoá nắp máy xem việc đóng mở nắp có bình thường tốt không;

+ Mặt máy có gì hư hỏng không;

+ Dây tiếp đất xem còn tốt không.

+ Trong quá trình kiểm tra bảo dưỡng máy phải rút phích điện để bảo đảm an toàn cho người và máy.

#### 1.4.2. Công việc định kỳ

- Hàng năm máy cần phải được kiểm tra, bảo dưỡng định kỳ. Việc kiểm tra bảo dưỡng các chức năng của máy ly tâm cần phải được thực hiện bởi các nhân viên bảo dưỡng chuyên nghiệp, có tay nghề. Công việc kiểm tra bao gồm làm sạch, thay thế chổi than, kiểm định bộ đặt thời gian ly tâm, chuẩn tốc độ quay của động cơ, cân bằng động, tĩnh của rotor, đo dòng điện rò,..

- Xem xét, kiểm tra bè ngoài và các phần của máy về sự mài mòn, rỗ và độ cứng vững của vỏ máy kim loại.

- Kiểm tra các ống chứa mẫu xét nghiệm có bị sứt, vỡ, rạn nứt hay không. Chỉ sử dụng các ống nghiệm có nắp vặn kín/lợ chứa chuyên dụng cho máy ly tâm.

- Trục quay truyền động cần được lau sạch bằng vải mềm trước khi lắp rotor vào máy để làm giảm khả năng mắc kẹt giữa rotor và trục quay. Định kỳ rửa sạch trục quay bằng nước ấm. Kiểm tra vòng bi, ổ đỡ để bôi trơn dầu mỡ đúng quy cách.

- Sau 6 tháng sử dụng, cỗ góp cần được vệ sinh một lần. Lau chùi sạch cỗ góp bằng vải mềm, kiểm tra sự tiếp xúc giữa chổi than và cỗ góp. Sau 500 giờ chạy máy, chổi than cần phải kiểm tra thay thế.

- Kiểm tra cân bằng động và tĩnh của máy ly tâm bằng cách đặt các ống chứa mẫu xét nghiệm đối xứng, có hình dạng giống nhau, kích thước bằng nhau và thể tích chứa của các ống đối diện nhau phải bằng nhau, sau đó cho máy quay với các tốc độ khác nhau.

- Kiểm tra những vết bẩn, xù xì và vết đổi màu trên rotor. Nếu phát hiện cần thông báo để kyp thời thay thế.

- Các rotor của máy siêu ly tâm cần phải được làm sạch một cách đặc biệt để ngăn ngừa những vết xước ở mặt ngoài, những vết xước này có thể gây ra tác dụng ứng suất tập trung tại các điểm và làm cho rotor không hoạt động.

- Dùng chát làm sạch không chứa chát ăn mòn để lau sạch các rotor một cách thường xuyên để cho trong đó chứa hoàn toàn không khí khô.

#### 1.4.3. An toàn khi sử dụng

- Tài trọng máy ly tâm cần phải có được sự cân bằng chính xác. Sự khác biệt nhau nhỏ về khối lượng của tài cũng có thể gây ra một lực không cân bằng lớn khi động cơ đang ở tốc độ cao, máy chạy bị rung không tách được các phần tử trong chất lỏng được. Lực không cân bằng này kéo căng trực quay và có thể gây ra sự hư hỏng đối với máy ly tâm hoặc gây thương tích cho người sử dụng.

- Không được tiếp xúc với rotor của máy ly tâm trong lúc chúng đang chuyển động, bởi sự quay tròn của các rotor có thể gây mất an toàn cho người sử dụng và thiết bị.

- Khi làm việc với những chất nguy hiểm, sự an toàn cho người sử dụng phải được xem xét. Thêm vào nắp đậy bên ngoài của máy ly tâm còn phải sử dụng các nắp đậy bên trong được lắp vào rotor và các giá treo hoặc các nắp của ống chứa mẫu xét nghiệm. Việc trợ giúp của những nắp an toàn và những nắp của giá treo/ống chứa còn có tác dụng ngăn ngừa việc tiếp xúc với mầm bệnh.

- Những miếng đệm đầm bảo chố tiếp xúc giữa nắp đậy và thân máy được bịt kín để ngăn ngừa không cho các chất nguy hiểm lọt ra ngoài. Ống thải được trang bị thêm vào một số loại máy mục đích khi các mẫu xét nghiệm tràn và các mảnh vỡ của ống chứa được loại bỏ ra ngoài.

- Những thủ tục và trang bị phòng hộ cá nhân, như kính bảo hộ và các tám

chắn bảo vệ mặt cần phải được sử dụng để làm giảm đến mức tối thiểu nguy hiểm cho người sử dụng khi phải tiếp xúc với mầm bệnh.

- Các bộ phận của máy ly tâm tiếp xúc với các chất nguy hiểm cần phải được tẩy sạch bằng hóa chất chuyên dụng.

**Bảng 1. Những hư hỏng thông thường ở máy ly tâm**

<b>Hiện tượng</b>	<b>Các nguyên nhân</b>	<b>Khắc phục</b>
1. Máy ly tâm không hoạt động	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mất nguồn cung cấp.</li> <li>- Công tắc nguồn</li> <li>- Thời gian đặt ly tâm bằng 0.</li> <li>- Nắp đậy chưa được chốt.</li> <li>- Cầu chì ngoài bị đứt.</li> <li>- các chổi than động cơ bị mòn hoặc hỏng.</li> <li>- Lỗi do các bộ phận ngoài.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cắm phích vào ổ cắm.</li> <li>- Bật công tắc nguồn.</li> <li>- Đặt lại thời gian ly tâm.</li> <li>- Đóng chốt nắp đậy một cách chắc chắn.</li> <li>- Thay thế cầu chì phù hợp với chỉ dẫn trong tài liệu hướng dẫn.</li> <li>- Thay thế các chổi than phù hợp với chỉ dẫn trong tài liệu hướng dẫn.</li> </ul>
2. Không phanh được rotor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Công tắc phanh bị hỏng</li> <li>- Hệ thống phanh bị hỏng</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra mạch điện phanh</li> <li>- Sửa chữa, thay thế</li> </ul>
3. Máy ly tâm rung động bất thường	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tải mất cân bằng</li> <li>- Chân đế bằng cao su sòn</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cân bằng lại tải theo chỉ dẫn.</li> <li>- Thay thế chân đế</li> </ul>
4. Tốc kế góc chỉ giá trị 0 hoặc tốc độ không đúng	<p>Tốc độ của máy ly tâm không vượt qua giới hạn 500 vòng/phút.</p> <p>Điều khiển tốc độ hoặc động cơ bị hư hỏng</p>	Quan sát khi tốc độ tăng trên 500 vòng/phút. Kiểm tra tốc kế góc, điều khiển tốc độ hoặc động cơ
5. Máy ly tâm không đạt được tốc độ lớn nhất theo lý thuyết	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Điện áp không đúng</li> <li>- Tốc kế góc, điều khiển tốc độ hoặc động cơ bị hư hỏng</li> </ul>	Kiểm tra lại nguồn cung cấp

## *1.5. Một số hư hỏng thường gặp*

### *1.5.1. Những hư hỏng đơn giản*

- Cháy cầu chì.
- Cáp điện đứt.
- Công tắc hỏng.
- Tiếp điểm nắp máy không tiếp xúc.
- Chổi than mòn hoặc không tiếp xúc với ốc gốp.
- Chiết áp điều chỉnh tốc độ hỏng.

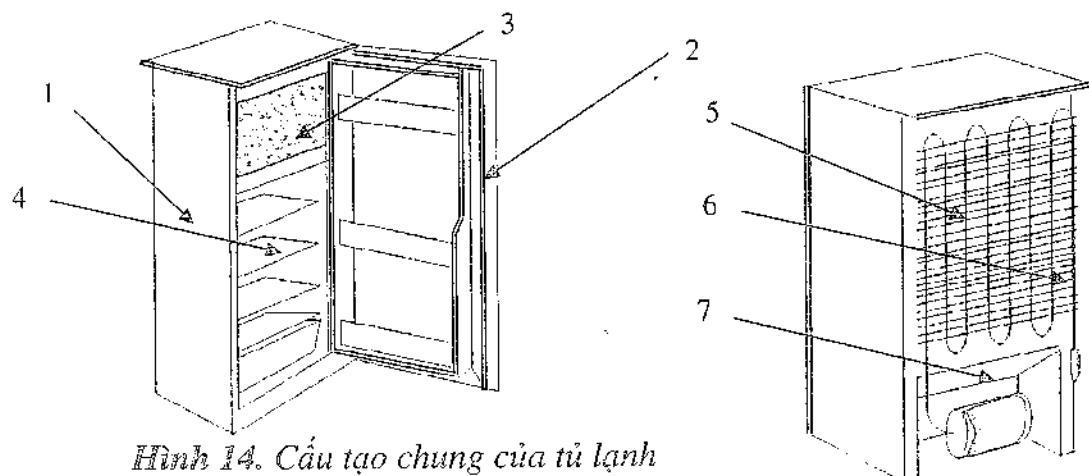
Tùng sự cố phải có cách kiểm tra để khẳng định chính xác chỗ hỏng.

### *1.5.2. Những hư hỏng thông thường ở máy ly tâm (xem bảng 1)*

## **2.Tủ lạnh bảo quản sinh phẩm**

### *2.1. Khái niệm*

Tủ lạnh là tủ được sử dụng để bảo quản sinh phẩm, hoá chất và các loại bệnh phẩm cần lưu giữ trong thời gian dài trong phạm vi nhiệt độ từ 4°C đến - 70°C.



*Hình 14. Cấu tạo chung của tủ lạnh*

- |                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| 1. Vỏ tủ lạnh                         | 5. Dàn ngưng |
| 2. Cánh tủ lạnh                       | 6. Fin lọc   |
| 3. Ngăn lạnh (có thể đạt nhiệt độ âm) | 7. Blôc      |
| 4. Ngăn mát (thường là 4-8 độ C)      |              |

Một tủ lạnh bao giờ cũng gồm hai bộ phận chính là hệ thống máy lạnh và vỏ cách nhiệt. Hai bộ phận này được ghép lại với nhau sao cho gọn gàng, thuận tiện nhất.

## 2.2 Nguyên tắc

Làm lạnh một vật tức là tạo điều kiện để giảm bớt số nhiệt lượng dự trữ trong vật đó. Để thực hiện việc hạ nhiệt độ cần có một chất thứ hai, lạnh hơn vật định làm lạnh để thu hút bớt nhiệt lượng. Chất này gọi là chất sinh hàn.

Muốn cho việc làm lạnh có kết quả tốt phải tìm được chất sinh hàn khi hút nhiệt lượng bên ngoài không tăng nhiệt độ lên, nếu không chỉ một lúc là nhiệt độ chất định làm lạnh và chất sinh hàn sẽ bằng nhau và việc làm lạnh ngừng lại.

Đặc tính nói trên thường thấy ở các chất rắn khi hoá lỏng hoặc khi tan ra. Một số chất lỏng trong quá trình bay hơi hay sôi cũng có thể thu hút nhiệt lượng bên ngoài mà không cần tăng nhiệt độ lên.

Một khi thay đổi hình thể, từ rắn sang lỏng hoặc từ lỏng sang thể hơi cần thêm nhiệt lượng lấy từ ngoài vào để làm giảm bớt lực liên kết giữa các phân tử.

Do vậy, nguyên tắc chung của các tủ lạnh là dùng chất sinh hàn ở thể lỏng cho bay hơi qua chỗ để các chất định làm giảm nhiệt độ. Lúc bay hơi chất sinh hàn qua bộ phận ngưng tụ, ở đây sẽ hút nhiệt lượng của nước hay không khí xung quanh để rồi lại trở thành chất lỏng. Chất lỏng sau đó được đẩy đi để tiến hành một quá trình làm lạnh mới.

## 2.3. Sử dụng và bảo quản

- Quy tắc sử dụng các loại tủ lạnh nói chung có mấy điểm dưới đây:

+ Phải biết khả năng làm lạnh của từng loại tủ. Các tủ lạnh thông thường chỉ có thể giữ được nhiệt độ từ  $8^{\circ}\text{C}$  tới  $2^{\circ}\text{C}$ . Ở phía trên gần bộ phận bốc hơi (dàn lạnh) có thể tạo ra nhiệt độ từ  $-12^{\circ}\text{C}$  tới  $8^{\circ}\text{C}$ .

+ Nhiệt độ nói trên chỉ đạt được với điều kiện môi trường xung quanh là  $+25^{\circ}\text{C}$  trở xuống, nếu nóng hơn thì nhiệt độ trong tủ sẽ tăng lên.

**Với các loại tủ lạnh nhiệt độ có thể xuống tới  $-70^{\circ}\text{C}$ .**

+ Trong lúc dùng, không nên để các chất bay hơi làm hại kim loại trong tủ. Không để vật gì quá nặng trên sức chịu đựng của các ngăn. Những vật gì đã có mùi, bị hư hỏng nên cho ra ngoài kỵ thời khói ảnh hưởng tới đồ còn lại.

+ Thường kỳ phải lau chùi trong và ngoài tủ. Hai ba tháng một lần, dọn hết đồ trong tủ ra ngoài, làm tổng vệ sinh rửa lồng tủ bằng xà phòng rồi lau thật khô.

*Chú ý: khi cạo nước đá bám vào thành tủ không được dùng vật sắc có thể chọc thủng các bộ phận ống dẫn.*

- + Tránh mở tủ ra luôn nếu không cần thiết để giữ nhiệt ở trong được thấp.
- + Tủ lạnh phải để chỗ cố định, nếu phải di chuyển, tránh va chạm mạnh có thể làm bong các lớp cách nhiệt và làm hở các ống dẫn chất sinh hàn. Di chuyển xa phải đóng gói cẩn thận, chú ý bảo vệ mặt sau tủ đặc biệt là bộ phận ngưng tụ. Các ống dẫn ở bộ phận này rất mỏng, lại để hở cho nên có vật gì sắc chạm phải cũng có thể thủng.
- + Trong khi sử dụng, được tự tiện tháo mở các bộ phận của máy, gấp gù nghi vấn nên nhờ người có trách nhiệm xem xét.

## Bài 9

# THAO TÁC VÔ TRÙNG

### Mục tiêu

1. *Trình bày được tầm quan trọng của thao tác vô trùng trong phòng xét nghiệm vi sinh vật.*
2. *Thực hiện đúng một số thao tác vô trùng cơ bản trong xét nghiệm vi sinh vật.*

### 1. Khái niệm và tầm quan trọng

#### 1.1. Khái niệm

Thao tác vô trùng là tất cả những việc làm trong quá trình thực hiện một quy trình kỹ thuật, không để cho vi sinh vật từ môi trường hoặc từ người thực hiện nhiễm vào đối tượng, vật liệu xét nghiệm và ngược lại.

#### 1.2. Tầm quan trọng

Thao tác vô trùng là kỹ thuật quan trọng trong xét nghiệm vi sinh vật. Nếu không thực hiện đúng thao tác vô trùng có thể dẫn đến những hậu quả sau:

##### 1.2.1. Hỗn vật liệu xét nghiệm

Tất cả các môi trường nuôi cấy vi sinh vật đều đòi hỏi phải vô trùng. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật nếu bị bội nhiễm và không được bảo quản lạnh thì sẽ bị hỏng. Ngoài môi trường nuôi cấy, các sinh phẩm như kháng huyết thanh, kháng nguyên, bệnh phẩm và một số hoá chất... cũng có đủ điều kiện cho vi sinh vật bội nhiễm phát triển và làm hỏng.

##### 1.2.2. Không đánh giá được kết quả hoặc làm sai lệch kết quả

Nếu vật liệu xét nghiệm bị bội nhiễm không được kiểm tra phát hiện, hoặc bị bội nhiễm trong quá trình thực hiện kỹ thuật, có thể làm hỏng hoàn toàn xét nghiệm không đánh giá được kết quả. Khi lấy bệnh phẩm hoặc trong quá trình phân lập nếu bị bội nhiễm, vi sinh vật bội nhiễm có thể phát triển lấn át vi sinh vật là căn nguyên của bệnh nhiễm trùng. Đôi với những vi sinh vật gây bệnh cơ hội nhiều khi rất khó xác định vi sinh vật phân lập được có phải là căn nguyên hay chỉ là bội nhiễm. Nếu môi trường định danh tính chất sinh vật hoá học bị bội nhiễm sẽ dẫn đến định danh sai, làm cho kết quả không phù hợp.

### *1.2.3. Làm mất hoặc biến đổi vi sinh vật đang lưu giữ*

Các vi sinh vật được giữ chung trong những môi trường thích hợp. Quá trình lưu giữ này phải đảm bảo vô trùng tránh không để bị nhiễm các vi sinh vật từ bên ngoài vào, làm cho các vi sinh vật được giữ bị lẩn át hoặc có sự trao đổi chất liệu di truyền gây biến chủng.

### *1.2.4. Ô nhiễm môi trường*

Vi sinh vật từ các loại bệnh phẩm, từ môi trường nuôi cây có thể gây nhiễm ra môi trường sống bên ngoài.

### *1.2.5. Gây nhiễm trùng cho cán bộ y tế và bệnh nhân*

Trong quá trình thực hiện kỹ thuật, nếu không thực hiện đúng các thao tác vô trùng, người làm xét nghiệm có thể bị nhiễm trùng hoặc trong quá trình lấy mẫu xét nghiệm trên bệnh nhân, nếu không thực hiện đúng thao tác vô trùng có thể gây nhiễm trùng cho bệnh nhân.

## **2. Các dụng cụ cần thiết để tiến hành cây vô trùng**

### *2.1. Phòng xét nghiệm*

Được khử trùng: phòng xét nghiệm phải được khử trùng bằng hoá chất sát trùng thích hợp.

Không có luồng gió lưu thông: Tất cả các cửa phòng xét nghiệm đều phải đóng kín và không sử dụng quạt.

### *2.2. Bóc vô trùng*

*2.3. Đèn khử trùng:* dùng đèn cồn để khử trùng que cây trong quá trình xử lý, nuôi cây, phân lập vi sinh vật

*2.4. Các dụng cụ vô trùng khác:* đĩa petri, ống nghiệm, pipet... phải tiệt trùng.

### *2.5. Trang thiết bị bảo hộ cho người làm xét nghiệm*

Mũ, khẩu trang, áo choàng...

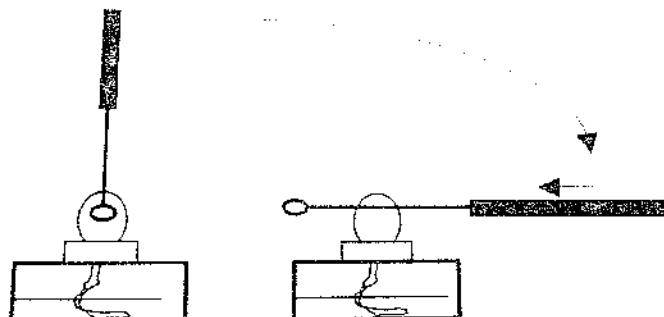
## **3. Một số thao tác vô trùng cơ bản**

### *3.1. Tiệt trùng que cây*

- Tiệt trùng que cây trước khi lấy mẫu xét nghiệm: Dưa que cây vào ngọn lửa đèn cồn, giữ que cây đứng thẳng, để cho vòng tròn đầu kim loại chìm

trong nửa trên của ngọn đèn, khi đầu que nóng đỏ thì cho que cây nằm ngang rồi đẩy lên phía trên để tiệt trùng tiếp phần thân que cây.

- Tiệt trùng que cây sau khi sử dụng: Que cây phải được tiệt trùng sau khi sử dụng. Thao tác giống như tiệt trùng que cây trước khi lấy mẫu xét nghiệm

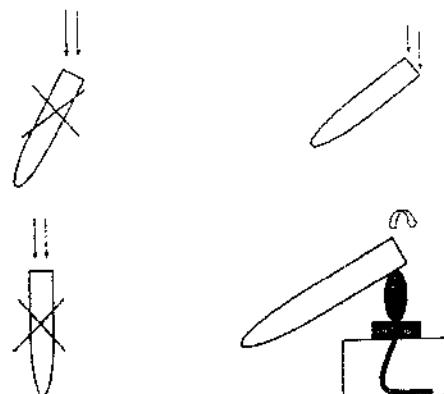


**Hình 15. Đốt que cây trên ngọn lửa đèn cồn**

### 3.2. Thao tác với ống nghiệm

- Trước khi mở nút, ống nghiệm phải được cầm nghiêng một góc nhỏ hơn 45 độ so với mặt phẳng ngang. Nếu ống nghiệm mở ở tư thế đứng thẳng hoặc nghiêng một góc lớn, bụi bẩn hoặc các vi sinh vật trong không khí có thể rơi vào trong ống nghiệm gây nhiễm bẩn.

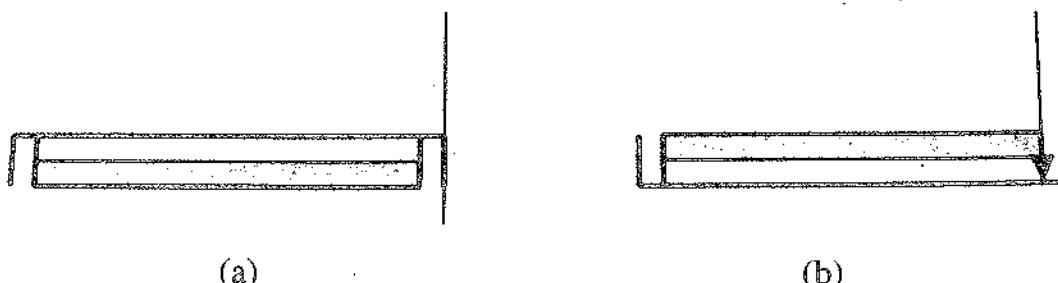
- Ngay sau khi mở và trước khi nút, ống nghiệm phải được hơ trên ngọn lửa đèn cồn, nhằm mục đích tiêu diệt các vi sinh vật bám ở miệng và phần thành ống sát miệng. Hơ đủ nóng, vừa hơ vừa xoay để toàn bộ miệng ống được nóng đều.



**Hình 16. Tư thế cầm ống nghiệm**

### 3.3. Cách để đĩa petri

- Trên bàn: Khi đĩa petri không được gói để trên bàn thì nắp phải ở trên. Nếu để đĩa lật ngược bụi hoặc vi sinh vật trong không khí sẽ rơi vào khe giữa nắp và đĩa, vì vậy có thể rơi vào môi trường nuôi cấy.
- Trong tủ âm: Sau khi đã cấy hoặc làm kháng sinh đồ, đĩa petri được đặt ngược trong tủ âm (nắp ở phía dưới) để hạn chế sự bay hơi nước từ môi trường thạch.



Hình 17. Đĩa petri đặt ở trên bàn tư thế đúng (a) và sai (b)

### 3.4. Cấy phân vùng trên môi trường phân lập

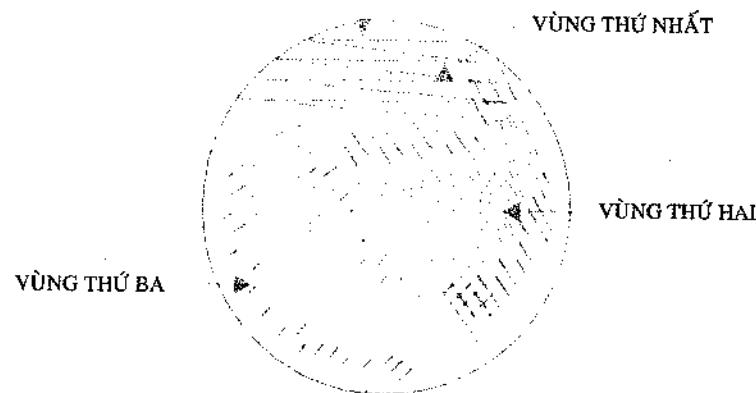
Phân lập một loại vi khuẩn là kỹ thuật nhằm tách vi khuẩn đó từ một mẫu xét nghiệm có thể có nhiều loại vi khuẩn khác nhau. Kết quả của quá trình này là có được vi khuẩn thuần nhất

Kỹ thuật cấy phân vùng được thực hiện theo trình tự sau:

- Lấy mẫu cần phân lập vi khuẩn đưa vào môi trường: Dùng que cấy vô trùng lấy mẫu đặt vào một vị trí gần rìa đĩa môi trường.
- Tạo vùng thứ nhất: Dùng que cấy đã tiệt trùng ria qua nơi đã đặt mẫu xét nghiệm tạo thành một vùng chiếm khoảng  $1/4$  diện tích đĩa môi trường.
- Tạo vùng thứ hai: Đốt que cấy để tiệt trùng sau đó ria để tạo vùng thứ hai. Những đường ria đầu tiên cắt vào một đầu các đường ria cuối của vùng thứ nhất. Diện tích vùng thứ hai chiếm khoảng  $1/3$  diện tích đĩa môi trường.
- Tạo vùng thứ ba: Đảo mặt que cấy rồi ria tạo vùng thứ ba, cách làm tương tự như ria tạo vùng thứ hai. Diện tích vùng thứ ba cũng chiếm khoảng  $1/3$  diện tích đĩa môi trường.

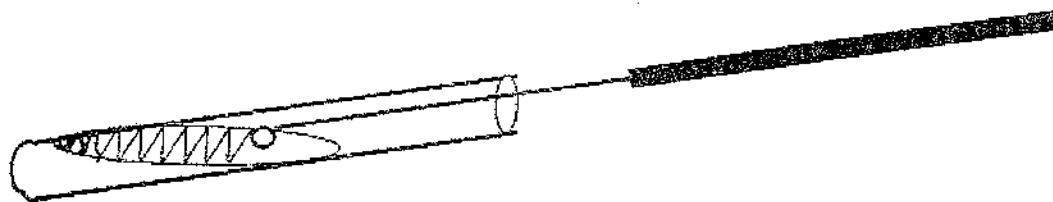
**Chú ý:** Các đường ria cấy càng xít nhau càng tận dụng được diện tích bề mặt môi trường để dàn mỏng mẫu xét nghiệm.

MẪU XÉT NGHIỆM

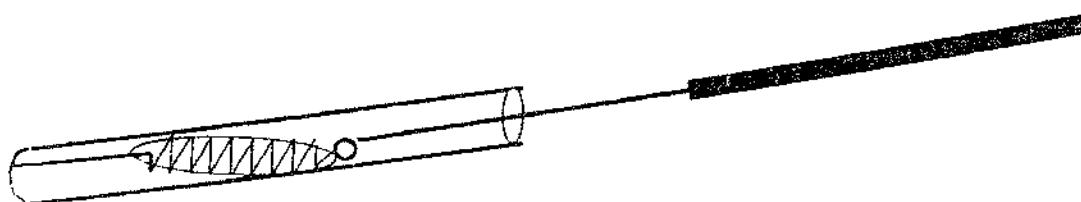


*Hình18. Sơ đồ cấy phân vùng trên đĩa mồi trường phân lập*

### 3.5. Cấy vi khuẩn lên mồi trường thạch nghiêng



*Hình19. Ria cấy vi khuẩn lên mặt thạch nghiêng*



*Hình20. Cấy vi khuẩn vào ống thạch nghiêng, có cả phần đứng*

Môi trường đặc được đun nóng hoá lỏng, đổ vào ống nghiệm, giữ ống ở tư thế nghiêng thích hợp, chờ thạch đặc lại sẽ được ống thạch nghiêng.

Kỹ thuật cấy trên thạch nghiêng được thực hiện theo trình tự sau:

- Dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn, nếu là huyền dịch thì lấy một ăng cấy, nếu là khuẩn lạc thì chạm đầu que cấy lên mặt khuẩn lạc là đủ.
- Mở nút ống mồi trường, khử trùng miệng ống, rồi đặt đầu que cấy đã lấy vi khuẩn vào chỗ thấp nhất của mặt thạch, ria đi ria lại nhiều lần, sau đó vừa ria vừa đưa đầu que cấy lên cao đến hết mặt thạch.

- Khử khuẩn miệng ống rồi nút ống môi trường. Khử khuẩn que cấy đặt lên giá. Đặt ống môi trường đã ria cấy vào tủ âm.
- Đối với môi trường xác định tính chất sinh vật hoá học của vi khuẩn, ống môi trường có thể có cả phần đứng và phần nghiêng. Đầu tiên vi khuẩn được cắm sâu vào phần đứng, sau đó kéo que cấy lên ria trên bề mặt phần nghiêng.

### CHƯƠNG III

## CÁC KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM VI KHUẨN

### Bài 10

### NHUỘM GRAM

#### *Mục tiêu*

1. Chuẩn bị được thuốc nhuộm và bộ dụng cụ để tiến hành nhuộm Gram.
2. Thực hiện được các bước nhuộm Gram từ bệnh phẩm.
3. Phân biệt được đúng vi khuẩn bắt màu Gram dương và Gram âm.

#### **1. Giới thiệu**

Nhuộm Gram là một phương pháp nhuộm do Gram sáng chế năm 1884. Phương pháp này giúp phân biệt vi khuẩn bắt màu Gram (Gram dương) và vi khuẩn không bắt màu Gram (Gram âm), từ đó giúp cho việc chẩn đoán xác định loại vi khuẩn.

#### **2. Chuẩn bị thuốc thử**

- Dung dịch tím gentian.
- Dung dịch lugol.
- Cồn tẩy 95°.
- Dung dịch đỏ fucshin pha loãng 1/10.

#### **3. Kỹ thuật nhuộm**

- (1). Dàn bệnh phẩm hoặc vi khuẩn lên trên lam kính sạch
- (2). Cố định bằng cách hơ qua trên ngọn lửa đèn cồn. Để nguội
- (3). Nhuộm:

- Phù dung dịch tím gentian, để khoảng 30 giây. Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.
- Phù dung dịch lugol để cố định màu, để khoảng 30 giây. Rửa dưới vòi nước.
- Tẩy màu bằng cồn 95°, để khoảng 30 giây. Rửa nước.

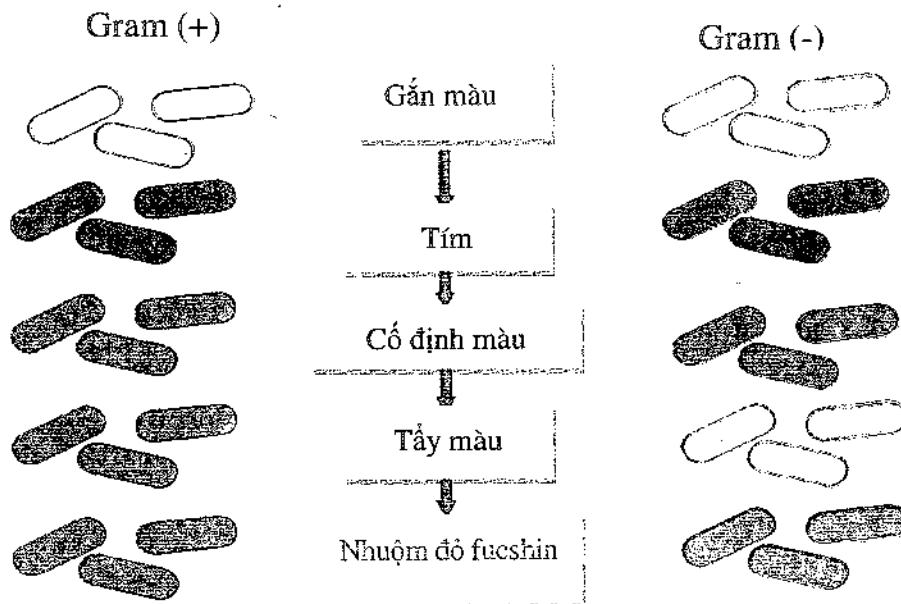
- Phủ dung dịch đỏ fuchsin 1/10 của Gram, để khoảng 30 giây. Rửa dưới vòi nước.

(4). Để khô tự nhiên

(5). Soi dưới vật kính dầu

### 3. Nguyên tắc nhuộm

- Nhuộm tím gentian: Nhuộm tất cả vi khuẩn thành màu tím đen.
- Nhỏ lugol: Gắn màu tím vào vi khuẩn đậm hay nhạt tùy loại.
- Tẩy cồn 95<sup>o</sup>: Tẩy màu một số vi khuẩn mà dung dịch lugol không gắn chắc màu tím vào được. Không tẩy màu một số vi khuẩn mà màu tím đã được dung dịch lugol gắn chắc vào. Bước tẩy cồn rất quan trọng nên phải thật chú ý trong quá trình nhuộm.
- Nhuộm đỏ fuchsin: Nhuộm đỏ trở lại những vi khuẩn đã bị cồn tẩy màu. Không có tác dụng trên vi khuẩn đã bị nhuộm tím đen.



*Hình 21. Nguyên lý nhuộm Gram*

### 4. Cơ chế bắt màu Gram

Có sự khác biệt giữa vi khuẩn Gram (+) và vi khuẩn Gram (-) về cấu tạo của lớp peptidoglycan (murein) ở thành tế bào vi khuẩn.

- Các vi khuẩn Gram (+) có lớp peptidoglycan dày hơn làm cho vi khuẩn giữ chắc màu tím gentian và không bị tẩy màu bởi cồn. Sau khi nhuộm fucshin, vi khuẩn không bắt màu đỏ mà vẫn giữ nguyên màu tím, đó là vi khuẩn Gram (+).

- Các vi khuẩn Gram (-) có lớp peptidoglycan mỏng hơn làm cho vi khuẩn không giữ được màu tím gentian và bị tẩy màu bởi cồn trở thành không màu. Khi nhuộm fucshin vi khuẩn bắt màu đỏ, đó là vi khuẩn Gram (-).

## 5. Đọc kết quả

- Vi khuẩn Gram (+) bắt màu tím sẫm gentian: Tụ cầu, liên cầu, phế cầu, trực khuẩn khuẩn bạch hầu, trực khuẩn than.
- Vi khuẩn Gram (-) không bắt màu tím gentian nên có màu đỏ fucshin: Lậu cầu, não mô cầu, *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, tả.

## 6. Lưu ý về nguyên nhân nhuộm sai

### *Gram dương giả*

- Do tiêu bản được cố định khi chưa khô, tiêu bản quá dày.
- Cặn thuốc nhuộm (phải lọc trước khi dùng).
- Đồ chưa hết lugol.
- Tẩy cồn chưa đủ thời gian.
- Dung dịch fucshin quá đậm hay nhuộm quá lâu.

### *Gram âm giả*

- Do không thay lugol
- Tẩy cồn quá lâu và tráng không kỹ.

Bảng kiểm cho kỹ thuật nhuộm GRAM

TT	Các bước tiến hành kỹ thuật	Y	N
1.	<b>Chuẩn bị thuốc nhuộm:</b> tím gentian, lugol, cồn 95°, đòn fucshin pha loãng 1/10. <b>Dụng cụ:</b> lam kính, đèn cồn, diêm, bút viết lam, tăm bông, nước muối sinh lý, vòi nước chảy nhẹ, bình đựng chất thải bỏ, đồng hồ bấm giây.		
2.	<b>Đánh dấu lam kính:</b> đánh số bệnh phẩm hoặc ký hiệu bệnh phẩm vào bên góc, mặt trái lam nhuộm.		
3	<b>Dàn bệnh phẩm:</b> hoặc khuẩn lạc vi khuẩn lên trên lam kính sạch.		
4.	<b>Cô định bệnh phẩm:</b> bằng cách hơ trên ngọn lửa đèn cồn, để nguội.		
5.	Phủ dung dịch tím gentian, đê 30 giây. Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.		
6.	Phủ dung dịch lugol để cô định màu, đê 30 giây. Rửa dưới vòi nước.		
7.	Tẩy màu bằng cồn 95°, đê 30 giây. Rửa nước.		
8.	Phủ dung dịch Fucshin 1/10, đê 30 giây. Rửa dưới vòi nước.		
9.	Để khô tự nhiên.		
10.	Soi dưới vật kính dầu(100X).		

**Bài 11**  
**XÉT NGHIỆM AFB**  
**BÀNG KÝ THUẬT NHUỘM ZIEHL - NEELSEN**  
**(AFB - Acid Fast Bacilli: trực khuẩn kháng acid)**

***Mục tiêu***

1. Chuẩn bị được thuốc nhuộm và dụng cụ tiến hành nhuộm Ziehl-Neelsen.
2. Thực hiện được các bước nhuộm Ziehl-Neelsen từ bệnh phẩm đờm.
3. Phát hiện được AFB từ tiêu bản nhuộm.
4. Đánh giá được sáu tiêu chuẩn chất lượng tiêu bản.

**1. Lấy và vận chuyển bệnh phẩm đờm**

***1.1. Lấy bệnh phẩm***

- Tốt nhất lấy 3 mẫu:
  - + Mẫu I: Lần đầu đến khám.
  - + Mẫu II: Lấy vào buổi sáng dậy (tốt nhất).
  - + Mẫu III: Lấy tại chổ bác sĩ.
- Lấy bệnh phẩm ngoài trời thông thoáng, nơi ít người, không nên tập trung vào 1 chỗ.
- Bệnh phẩm được lấy vào hộp nhựa sạch, có nắp xoáy, trong, có nhãn. Bệnh phẩm là đờm, không phải nước bọt hay nước mũi.

***1.2. Vận chuyển bệnh phẩm***

- Bệnh phẩm phải chuyển ngay tới phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt theo quy trình an toàn.
- Không để bệnh phẩm trong môi trường nhiệt độ quá cao khi vận chuyển.

**2. Quy trình dàn tiêu bản**

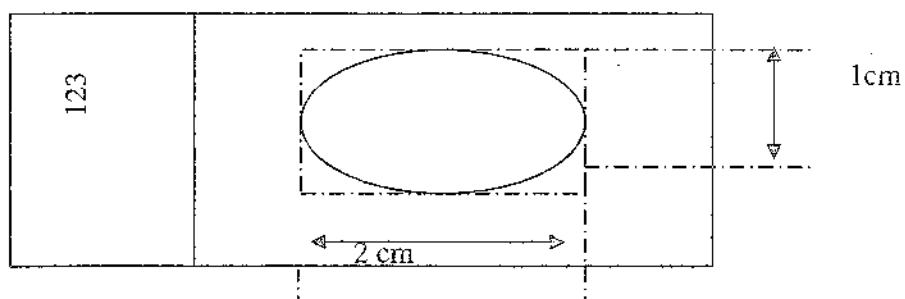
***2.1. Ghi số tiêu bản***

- Sử dụng lam kính mới, sạch có đầu mờ.
- Bút chì HB.
- Số thứ tự (được đánh từ đầu năm) vào đầu mờ của lam kính.

- Số xét nghiệm phải đồng nhất giữa số xét nghiệm, phiếu xét nghiệm, cốc đờm và lam kính.

## 2.2. Dàn tiêu bản

- Thực hiện nơi thông khí tốt hoặc trong tủ an toàn sinh học:
  - + Que phết bằng tre, gỗ chè nhỏ, đầu vát, sạch, khô. Mỗi bệnh phẩm dùng que phết riêng.
  - + Chọn lấy chỗ đờm nhày mủ, đặt lên giữa lam kính dàn trải theo vòng xoáy từ trong ra ngoài, dàn đều đặn liên tục tạo độ mịn dày vừa phải hình ô van kích thước dài 2 cm rộng 1cm.



- + Dàn xong ngâm que vào dung dịch sát khuẩn (phenol 5% hoặc javen 0,5%).
- + Chỉ huỷ lọ đờm sau khi đã trả kết quả xét nghiệm.
- Tiêu bản đạt tiêu chuẩn:
  - + Dàn từ phần đờm nhày mủ.
  - + Dàn đều đặn, liên tục, mịn.
  - + Kích thước 1 cm × 2 cm.
  - + Vết dàn cân đối ở giữa lam.
  - + Độ dày vừa phải.
  - + Đέ khô tự nhiên trước khi cố định.

## 2.3. Làm khô tiêu bản

- Để tiêu bản khô tự nhiên, hoàn toàn ở nhiệt độ phòng (15-30 phút).
- Không làm khô tiêu bản bằng đèn cồn hoặc ánh nắng mặt trời.

## 2.4. Cố định tiêu bản (*Thực hiện ở ngoài tủ an toàn sinh học*)

- Cố định bằng cách hơ nóng tiêu bản qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần, mỗi lần 3 giây.
- Không cố định khi tiêu bản chưa khô hoàn toàn.

cốc  
n้ำ  
tâm  
hồng  
hỗ  
v)

### 3. Quy trình nhuộm Ziehl - Neelsen

#### 3.1. Chuẩn bị hóa chất nhuộm

##### 3.1.1. Dung dịch fucshin 0,3%

- Fucshin basic 3g
- Phenol 50g
- Cồn 95° 100ml
- Nước cất vừa đủ 1000ml
- Cách pha: cho 50g phenol vào bình cầu hoặc bình nón.
- Đổ 100ml cồn, lắc tan.
- Thêm 3g fucshin basic, trộn đều.
- Cho nước cất vừa đủ 1000 ml, lắc đều.
- Lọc fucshin qua giấy lọc.
- Kiểm tra chất lượng hoá chất bằng tiêu bản dương tính và âm tính trước khi sử dụng.

##### 3.1.2. Dung dịch cồn tẩy HCL 3%

- HCL 30ml
- Cồn ethylic 95° 970ml

Rót từ từ HCL vào cồn tránh gây nổ, vỡ do sinh nhiệt (không được làm ngược lại).

##### 3.1.3. Dung dịch methylen 0,3%

- Xanh methylen 3g
- Nước cất 1000ml

Hoà 1000ml nước cất với 3g xanh methylen lắc đều.

Tất cả các hóa chất trên chứa trong chai thuỷ tinh màu, có nhãn ghi tên hóa chất, nồng độ và ngày pha. Hóa chất được lưu giữ trong tủ khô ráo tránh ánh sáng mặt trời. Hạn sử dụng 1 tháng.

### 3.2. Các bước nhuộm

#### 3.2.1. Nhuộm màu

- Phù đầy dung dịch fucshin 0,3% lên mặt phết tiêu bản đã được cố định.
- Hơ nóng bằng cồn đến khi bốc hơi (không được sôi) 1 lần.
- Để nguội 5 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.

### 3.2.2. Tẩy màu

- Phù đầy dung dịch cồn tẩy HCL 3%.
- Đέ 3 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.
- Tẩy lại lần 2 (1-3 phút) nếu tiêu bản còn màu hồng.

### 3.2.3. Nhuộm nền

- Phù dung dịch xanh methylen 0,3% trong 1 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.
- Đέ khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng hoặc ở trên máy sấy lam.

Lưu ý: mỗi mẻ nhuộm không nên quá 12 tiêu bản, các tiêu bản để cách nhau ít nhất 1 cm.

## 4. Đọc và nhận định kết quả

Vi khuẩn lao là trực khuẩn hình que, mảnh, hơi cong, bắt màu đỏ fucshin, đứng riêng lẻ, từng đôi hoặc thành từng đám trên nền xanh. Đếm số lượng AFB và ghi kết quả như bảng 1.

Bảng 1. Quy định đọc kết quả

Số lượng AFB	Kết quả	Phân loại
> 10 AFB/ 1 vi trường	Dương tính (Soi ít nhất 20 vi trường)	3+
1-10 AFB/ 1 vi trường	Dương tính (Soi ít nhất 50 vi trường)	2+
10-99 AFB/ 100 vi trường	Dương tính	1+
1-9 AFB/ 100 vi trường	Dương tính	Ghi số lượng cụ thể
Không AFB/ 100 vi trường	Âm tính	

Lưu ý: 1 dòng làm tương đương 100 vi trường. Soi ít nhất 3 dòng.

## 5. Sáu tiêu chuẩn đánh giá tiêu bản

### (1). Chất lượng bệnh phẩm

- Quan sát: tốt nhất là bệnh phẩm có nhày mủ, không có nước bọt, không có máu.
- Soi kính:
  - + Có > 25 bạch cầu đa nhân/1 vi trường (soi vật kính 10X).
  - + Có > 3-4 bạch cầu đa nhân/1 vi trường (soi vật kính 100X).
  - + Hoặc có đại thực bào.

### (2). Kích cỡ

- Hình ovan nằm giữa lam kính
- Chiều rộng 1cm, chiều dài 2cm

### (3). Độ mịn

- Bề mặt tiêu bản liên tục, đều đặn, không bị rỗng, bong.
- Soi kính: Các vi trường liên tục không có nhiều vi trường rỗng độ sáng đều.

### (4). Độ dày

- Độ dày tiêu bản khoảng 0,04mm. Kiểm tra bằng cách khi tiêu bản khô chưa nhuộm để 1 tờ giấy có in chữ xuống dưới tiêu bản cách 4-5 cm. Nếu nhìn thấy chữ mờ có thể đọc được là đạt, nếu không đọc được chữ là quá dày, nhìn chữ rõ là mỏng.
- Soi thấu chiều sâu của tiêu bản (vi trường màu xanh sáng).
- Nếu tiêu bản quá dày: Nhiều lớp, soi không thấu vi trường (vi trường màu xanh tối).
- Nếu tiêu bản quá mỏng: các vi trường thưa thớt (nền xanh nhạt).

### (5). Nhuộm và tẩy màu

- Tiêu bản nhìn bằng mắt thường còn màu đỏ là chưa đạt
- Soi kính:
  - + AFB bắt màu đỏ rõ ràng trên nền màu xanh
  - + AFB nhạt màu có thể do tẩy quá hoặc nhuộm chưa đủ (thời gian, sức nóng).
  - + Nếu AFB tối màu có thể do nhuộm nền quá lâu
- (6). Độ sạch
- Soi không thấy cặn bẩn, cặn fucshin, tinh thể... do thuốc nhuộm để lâu hoặc hơi nóng quá lâu.

## 6. Huỷ bỏ dụng cụ nhiễm khuẩn

Mẫu đờm, que phết đờm là nguồn lây nhiễm tiềm tàng nên sau khi xét nghiệm phải được huỷ bỏ theo đúng quy trình, tránh nguy cơ lây nhiễm.

Các dụng cụ khác như giá để lam, mặt bàn làm việc phải được khử bằng dung dịch sát khuẩn. Dung dịch sát khuẩn đã được chứng minh bằng thực nghiệm diệt được vi khuẩn lao là dung dịch phenol 5%, nước javen 0,5%.

*Bảng kiểm cho kỹ thuật nhuộm Ziehl - Neelsen*

TT	Các bước tiên hành kỹ thuật	Có	Không
1.	Chuẩn bị thuốc nhuộm: đỏ fucshin 0,3%, cồn tẩy HCL 3%, xanh methylen 0,3%. Dụng cụ: lam kính, đèn cồn, diêm, que gỗ, bút chì HB, vòi nước chảy nhẹ, bình đựng chất thải bò, đồng hồ bấm giây.		
2.	Đánh dấu lam kính: ghi số xét nghiệm thông nhất từ số xét nghiệm ,phiếu xét nghiệm ,cốc đờm và đầu mờ của lam kính.		
3.	Phết bệnh phẩm và đê khô: - Bệnh phẩm dàn đều hình oval đường kính 1 cm × 2 cm.		
4.	Cố định bệnh phẩm: - Cắt ngang qua ngọn lửa đèn cồn 3 giây.		
5.	Phủ đỏ fucshin kín mặt lam.Hơ nóng phía dưới lam cho fucshin 0,3% bốc hơi (1 lần), không sôi. Đê 5 phút.		
6.	Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.		
7.	Phủ dung dịch cồn tẩy HCL 0,3%.Đê 3 phút.		
8.	Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.		
9.	Phủ dung dịch xanh methylen 0,3%. Đê 1 phút.		
10.	Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.		
11	Rửa tiêu bản. Xếp vào giá.		
12	Sấy khô.		
13	Đem soi vật kính dầu và cất vào hộp lam.		

## Bài 12

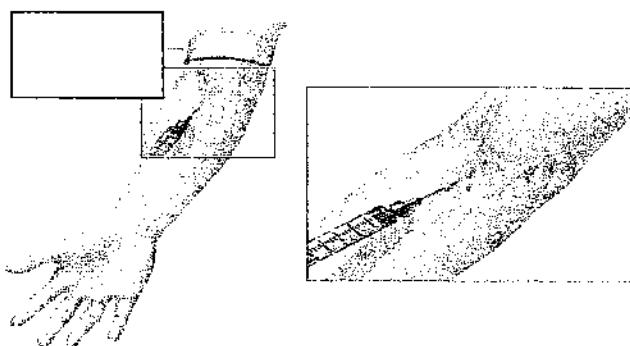
### XÉT NGHIỆM CÁY MÁU TÌM VI KHUẨN GÂY BỆNH

#### Mục tiêu

1. Thực hiện được các bước của kỹ thuật cây máu tìm vi khuẩn gây bệnh.
2. Phát hiện được chai cây máu dương tính và định hướng được loại vi khuẩn phát triển trong chai cây máu dương tính.
3. Đọc và nhận định được kết quả cây máu dương tính.

#### 1. Thời điểm lấy máu

- Lấy máu trước thời điểm người bệnh có biểu hiện rét run và bắt đầu sốt cao, trong vòng 30 phút, không được chậm chễ vì theo thời gian lượng vi khuẩn trong máu sẽ giảm xuống sau khi bệnh nhân hạ sốt
- Lấy máu trước khi sử dụng kháng sinh. Nếu đang sử dụng kháng sinh phải ngừng kháng sinh hoặc lấy máu trước thời điểm sử dụng liều kháng sinh tiếp theo.



Hình ảnh lấy máu tĩnh mạch cánh tay

#### 2. Số lần chỉ định cây máu

- Lấy 2 mẫu ở 2 vị trí, cùng thời điểm
- Lấy 2 mẫu ở cùng vị trí, cùng thời điểm
- Lấy máu nhiều lần/ 1 ngày (bệnh Osler)
- Lấy máu nhiều ngày liên tiếp

- Không nên chỉ định cây máu 1 mẫu

### 3. Kỹ thuật vô trùng khi lấy máu

Bảo đảm đúng kỹ thuật vô khuẩn, tránh nhiễm bẩn

- Chọn tĩnh mạch, buộc garô.
- Sát trùng da bằng cách xoay tròn từ tâm ra ngoài, Sử dụng cồn 70% và iodine 2% (1 phút) hoặc providone iodine (2 phút).
- Đέ khô 1 - 2 phút.
- Lấy máu bằng bơm tiêm vô trùng.
- Thay kim.
- Bơm nhẹ máu chảy dọc theo thành bình canh thang, trên lửa đèn cồn.
- Đậy nút chặc. Không lắc mạnh, tránh vỡ hồng cầu.
- Tháo garo, sát trùng da lại.

### 4. Môi trường cây máu

- Chai môi trường cây máu tự động: nên sử dụng 2 chai, một chai nuôi cây vi khuẩn hiếu khí và một chai nuôi cây vi khuẩn kỵ khí.
- Chai môi trường cây máu tự sản xuất: Canh thang glucose 2% hoặc BHI, thể tích 50 ml.

### 5. Khối lượng máu và tỷ lệ máu/môi trường

- Tỷ lệ khối lượng máu/ khối lượng môi trường là 1:5
- Đảm bảo đúng khối lượng máu cần lấy. Thông thường lấy vô trùng 10 ml máu cho vào 50 ml canh thang. Nếu sử dụng máy cây máu tự động: Người lớn lấy 10 ml/ 1 chai máu. Trẻ em: 3-5 ml/ 1 chai máu.

### 6. Điều kiện ủ ám

Sau khi lấy máu phải ủ ám chai máu càng sớm càng tốt, không nên để ngoài quá 2 tiếng.

Điều kiện ủ ám:

- + Nhiệt độ: 35 - 37°C.
- + Khí trường: Bình thường..
- + Thời gian: 1 - 7 ngày.

### 7. Đọc kết quả

#### 7.1. Theo dõi chai máu hàng ngày

Nếu có hiện tượng vi khuẩn mọc làm cạnh thang đục, có váng, có hạt... thì cấy chuyển cạnh thang vào môi trường thạch máu và Socola

### 7.2. Nhận định sơ bộ vi khuẩn mọc trong bình cạnh thang

- Tụ cầu thường mọc thành hạt nhỏ đều và có màng dù ở bề mặt.
- Liên cầu mọc lâng cặn ở đáy, thành bình như những cục bông hoặc mẩu bánh vụn.
- Các trực khuẩn Gram âm, cạnh thang đục đều (trừ thương hàn cạnh thang vẫn có thể trong, vi khuẩn tạo thành một lớp trắng bên trên đáy bình).
- *Pseudomonas spp* mọc có váng như váng dưa, cạnh thang đục, đôi khi có bọt.

### 7.3. Cấy chuyển

- Lắc đều bình cạnh thang.
- Dùng bơm tiêm hút khoảng 2 ml cạnh thang chuyển sang thạch máu.
- Các trường hợp viêm màng não mủ, viêm phổi ở trẻ em thì chuyển thêm vào môi trường Socola.

### 7.4. Điều kiện ủ ám

- Nhiệt độ: 35 – 37°C.
- Khí trường: bình thường.
- Thời gian: 16 – 18 giờ.

### 7.5. Định danh vi khuẩn

- Nhận định hình thái khuỷn lạc của từng loại vi khuẩn trên các loại môi trường:
  - + Hình dạng.
  - + Kích thước.
  - + Màu sắc.
  - + Độ bóng, khô, mờ.
  - + Bờ đều hay không đều.
  - + Tan máu.
  - + Mùi.
- Nhuộm Gram để xác định hình thể, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn.
- Xác định các tính chất hóa sinh của vi khuẩn bằng các giá đường ngắn, máy định danh vi khuẩn tự động hoặc bộ API 20.
- Ngưng kết với các kháng huyết thanh đa giá, đơn giá (nếu cần).

## 7. Đọc và nhận định kết quả

### 7.1. Âm tính

- Nếu sau 4 ngày theo dõi không thấy vi khuẩn mọc thì trả kết quả sơ bộ là âm tính, nhưng vẫn theo dõi tiếp bình máu đến hết ngày thứ 7.
- Sau 7 ngày nếu không thấy mọc phải cấy kiểm tra vào thạch máu trước khi bỏ bình máu.
- Nếu từ 5 - 7 ngày vi khuẩn mới mọc thì tiếp tục phân lập và định danh vi khuẩn rồi ghi giấy xét nghiệm trả lời thêm.

### 7.2. Dương tính

- Nếu phân lập được ≥ 1 lần vi khuẩn gây bệnh thường gặp.
- Nếu phân lập ≥ 2 lần cùng một loại vi khuẩn ít gặp.

### 7.3. Nhiễm bẩn

Nếu phân lập được các loại tụ cầu không đồng huyết tương (*Staphylococci coagulase negative*) cư trú trên da, hoặc trực khuẩn Gram dương có nha bào hoặc không có nha bào trong không khí.

### 7.4. Dương tính giả

Thường do vỡ hồng cầu.

## 8. Các vi khuẩn gây bệnh thường gặp ở máu

### 8.1. Vi khuẩn Gram âm

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Burkholderia cepacia*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Burkholderia pseudomallei*
- *Salmonella*

### 8.2. Vi khuẩn Gram dương

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus viridans*
- *Enterococcus* spp.
- *Staphylococcus*, coagulase negative
- *Streptococcus suis*
- *Streptococcus*, Group D (non-*Enterococci*)

## Bài 13

# XÉT NGHIỆM CÁY PHÂN TÌM VI KHUẨN GÂY BỆNH

### Mục tiêu

1. Thực hiện được các bước của kỹ thuật cây phân tìm vi khuẩn gây bệnh.
2. Lựa chọn đúng loại môi trường cây phân theo chỉ định của bác sĩ.
3. Định hướng đúng các loại khuẩn lạc phát triển trên các môi trường cây phân.
4. Kể được tên các loại vi sinh vật thường gây bệnh ở đường tiêu hóa.

#### 1. Quan sát đại thể

Nhận định tính chất phân: màu sắc, lòng, rắn, nhày máu, ký sinh trùng.

#### 2. Soi tươi

Chỉ thực hiện khi quan sát hiện tượng di động của phảy khuẩn tả hoặc để phát hiện các loại ký sinh trùng, nấm.

#### 3. Nhuộm soi trực tiếp

- Nhuộm xanh methylen: quan sát bạch cầu đa nhân, hồng cầu.
- Nhuộm Gram: phát hiện các vi khuẩn có hình thể đặc biệt như phảy khuẩn tả, *Campylobacter*, tụ cầu, nấm men, các vi khuẩn khí ...

#### 4. Chọn môi trường nuôi cấy và điều kiện ủ ám

Dựa vào chẩn đoán lâm sàng để biết hướng vi khuẩn cần phân lập là loại gì. Dựa vào kết quả nhuộm xanh methylen, nhuộm Gram để chọn các loại môi trường cây phân thích hợp.

##### 4.1. Cây tìm *Salmonella*, *Shigella*, *E. Coli*, *Yersinia*

- Môi trường

- + Canh thang Selenite: Là môi trường tăng sinh cho các trực khuẩn đường ruột đặc biệt là *Salmonella*. Cây chuyển canh thang sang môi trường chọn lọc như DCA sau khi ủ ám qua đêm.

- + Mac Conkey

- + DCA hoặc SS, DCLS, EMB, Hektoen, XLD...
- Điều kiện ủ ám
  - + Nhiệt độ: 35 - 37°C.
  - + Khí trường: Bình thường.
  - + Thời gian: 16 – 18 giờ.

#### *4.2. Cây tìm các loại Vibrio, Aeromonas*

- Môi trường:
  - + Pepton kiềm: sau khi ủ ám 6 giờ, cây chuyển lần 2 sang thạch kiềm và TCBS.
    - + Thạch kiềm.
    - + TCBS.
- Điều kiện ủ ám:
  - + Nhiệt độ: 35 – 37°C.
  - + Khí trường: Bình thường.
  - + Thời gian: 16 – 18 giờ.

#### *4.3. S. aureus*

- Môi trường:
  - + Chapman: Khi soi trực tiếp có hình ảnh cầu khuẩn Gram dương xếp đám.
- Điều kiện ủ ám:
  - + Nhiệt độ: 35 - 37°C
  - + Khí trường: bình thường
  - + Thời gian: 16 - 18 giờ

#### *4.4. Căn nguyên gây ngộ độc thức ăn*

- Môi trường:
  - + Canh thang Selenit.
  - + Mac Conkey.
  - + DCA, SS, EMB, Hektoen, XLD...
  - + Pep ton kiềm.
  - + Thạch kiềm.
  - + TCBS.
  - + Chapman

- Điều kiện ủ ấm:
  - + Nhiệt độ: 35 - 37°C.
  - + Khí trường: Bình thường.
  - + Thời gian: 16 - 18 giờ.

#### 4.5. *Campylobacter*

- Môi trường:
  - + Campylobacter agar: thạch máu Colombia 10% cho thêm 5 loại kháng sinh để ức chế các vi khuẩn khác.
  - Điều kiện ủ ấm:
    - + Nhiệt độ: 42°C.
    - + Khí trường: 10% CO<sub>2</sub>.
    - + Thời gian: 18 - 48 giờ.

#### 4.6. Các vi khuẩn kỵ khí

- Môi trường:
  - + Anaerobic agar.
- Điều kiện ủ ấm:
  - + Nhiệt độ: 35 - 37°C.
  - + Khí trường: kỵ khí.
  - + Thời gian: 48 - 72 giờ.

### 5. Định danh vi khuẩn

#### 5.1. Nhận định hình thái khuỷn lạc của từng loại vi khuẩn trên các loại môi trường

##### *Mac Conkey*

- *E. coli*: khuỷn lạc đỏ, lactose (+).
- *Klebsiella, Enterobacter*: khuỷn lạc hồng, lactose (+) chậm.
- *Citrobacter, Serratia, Hafnia, Provindencia*: khuỷn lạc hồng nhạt sau 24 - 48 giờ, lactose (+) yếu.
- *Salmonella, Shigella, Proteus, Edwardsiella*: khuỷn lạc trong hoặc hơi giống màu môi trường, lactose (-).

*DCA (Desoxycholate-Citrate-Agar), SS (Salmonella-Shigella)*

- *E.Coli*: khuẩn lạc đỏ đậm.
- *Klebsiella, Enterobacter*: khuẩn lạc hồng nhạt.
- *Salmonella*: khuẩn lạc không màu loại có nút đen.
- *Shigella*: khuẩn lạc không màu.
- *Pseudomonas*: khuẩn lạc không màu hoặc nâu, bờ không đều.
- Các vi khuẩn Gram (+): Bị úc chế nên không mọc hoặc mọc rất yếu.

### *5.2. Nhuộm Gram để xác định hình thể, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn*

*5.3. Xác định các tính chất hóa sinh của vi khuẩn bằng các giá đường ngắn, máy định danh vi khuẩn tự động hoặc bộ API 20.*

*5.4. Ngưng kết với các kháng huyết thanh đa giá, đơn giá đối với *E. Coli* (*EPEC*), *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*.*

## **6. Đọc kết quả**

- Dương tính: nuôi cấy phát hiện và định danh được vi khuẩn, nấm gây bệnh.
- Âm tính: không mọc vi khuẩn gây bệnh sau 48 giờ.

## **7. Nhận định kết quả**

### *7.1. Các vi khuẩn cư trú thông thường ở đại tràng*

- *Enterobacteriaceae*.
- *Enterococci*.
- *Lactobacillus*.
- *Pseudomonas spp.*
- *Staphylococci coagulase (-)*.
- Các vi khuẩn khí.
- Nấm men.

### *7.2. Các vi sinh vật gây bệnh ở đường tiêu hoá*

#### *7.2.1. Vi khuẩn*

Phần trên (dạ dày và hành tá tràng):

- *Helicobacter pylori*.

Phần dưới (đại tràng):

- *Salmonella*.
- *Shigella*.
- *Escherichia coli* (*EPEC*, *ETEC*, *EIEC*, *VTEC*).
- *Vibrio cholerae*.
- *Vibrio parahaemolyticus* và các *Vibrio* khác.
- *Aeromonas hydrophilia*, *A. Sobria*.
- nàu
- *Yersinia enterocolitica*.
- òng
- *Campylobacter*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Bacillus cereus*.
- coli
- *Clostridium perfringens*, *C. difficile* (Vi khuẩn ký khí).
- *Listeria*.

#### 7.2.2. Virus

- *Hepatitis A*.
- *Hepatitis E*.
- *Rotavirus*.
- *Poliovirus*.
- Nhóm virus Norwalk.

#### 7.2.3. Ký sinh trùng

Đon bào

- *Entamoeba histolytica*.
- *Giardia lamblia*.
- *Trichomonas hominis*.
- *Cryptosporidium*.
- *Cyclospora*.

Giun – Sán

### 8. Lưu ý:

- Nên dựa vào chẩn đoán lâm sàng để định hướng loại vi khuẩn, nấm gây bệnh cần phân lập.
- Nên dựa vào kết quả nhuộm xanh methylen, nhuộm Gram để chọn các loại môi trường nuôi cấy, phân lập thích hợp.

## Bài 14

# XÉT NGHIỆM CÁY MỦ TÌM VI KHUẨN GÂY BỆNH

### Mục tiêu

1. Thực hiện được các bước của kỹ thuật cấy mủ tìm vi khuẩn gây bệnh.
2. Mô tả được hình thể, cách sắp xếp và tính chất bắt màu của các loại vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm soi trực tiếp bệnh phẩm mủ.

### 1. Nhuộm soi trực tiếp

- Nhuộm Gram: quan sát hình thể, các sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn.
- Nhuộm Ziehl Neelsen: phát hiện AFB.

### 2. Nuôi cấy, phân lập

#### 2.1. Môi trường

- Canh thang BHI (Brain heart infusion) hoặc canh thang glucose 2%.
- Thạch máu đĩa.

#### 2.2. Nuôi cấy

Đỗ canh thang vào ống chứa que tăm bông bệnh phẩm. Lắc kỹ ống. Ria cấy que tăm bông lên thạch máu. Sau đó phết 2 lam kính làm tiêu bản nhuộm Gram và nhuộm AFB.

#### 2.3. Điều kiện ủ ám

- Nhiệt độ: 35 - 37°C.
- Khí trường: 5 - 7% CO<sub>2</sub>.
- Thời gian: 16 - 18 tiếng.

### 3. Đọc kết quả

Theo dõi sự mọc của vi khuẩn trong canh thang, nếu đục thì cấy chuyển sang thạch máu. Theo dõi sự mọc của vi khuẩn thạch máu, quan sát và nhận định khuẩn lạc.

#### 4. Định danh vi khuẩn

4.1. Nhận định hình thái khuẩn lạc của từng loại vi khuẩn trên các loại môi trường

- Hình dạng.
- Kích thước.
- Màu sắc.
- Độ bóng, khô, mỡ.
- Bờ đều hay không đều.
- Tan máu.
- Mùi.

4.2. Nhuộm Gram để xác định hình thể, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn

4.3. Xác định các tính chất hóa sinh của vi khuẩn bằng các giá đường ngắn, máy định danh vi khuẩn tự động hoặc bộ API 20.

4.4. Ngưng kết với các kháng huyết thanh đa giá, đơn giá (nếu cần).

#### 5. Nhận định kết quả

- Dương tính: nuôi cây và định danh được vi khuẩn, nấm. Tất cả các vi khuẩn mọc thuần đều được coi là vi khuẩn gây bệnh.
- Âm tính: không mọc vi khuẩn gây bệnh sau 48 giờ.

## Bài 15

# XÉT NGHIỆM CÁY ĐỜM TÌM VI KHUẨN GÂY BỆNH

### Mục tiêu

1. Thực hiện được các bước của kỹ thuật cây đờm tìm vi khuẩn gây bệnh.
2. Tính được số lượng vi khuẩn có trong 1ml đờm sau khi nuôi cây.

### 1. Quan sát đại thể

Nhận định màu sắc, mù, nhày, nước bọt, số lượng.

### 2. Xử lý bệnh phẩm

Rửa đờm 2 lần bằng nước muối sinh lý: đổ toàn bộ lọ đờm vào đĩa Petri có nước muối sinh lý. Dùng que cây nhặt một mẫu đờm (chỗ nghi ngờ nhất) khuấy đi khuấy lại vài lần cho hết nước bọt bám phía ngoài. Nhắc que cây có đờm sang đĩa Petri thứ 2 rồi lại tiếp tục làm như trên.

### 3. Soi trực tiếp

Lấy mảnh đờm đã được rửa 2 lần làm tiếp:

- **Nhuộm Gram soi vật kính 10X**
  - + Mẫu đờm đạt tiêu chuẩn: Số lượng > 25 BCĐN hoặc <10 tế bào biểu mô/1 vi trường.
  - + Đề nghị lấy lại bệnh phẩm nếu số lượng < 25 BCĐN hoặc > 10 tế bào biểu mô/1 vi trường.
- **Nhuộm Gram soi vật kính 100X**
  - + **Số lượng vi khuẩn:**
    - Không thấy.
    - Hiếm: < 1.
    - Thỉnh thoảng: 1 – 4.
    - Ít: 5 – 9.
    - Trung bình: 10 – 50.
    - Nhiều: > 50.
  - + **Loại vi khuẩn:**

• Có vi khuẩn, vi nấm: mô tả hình thể, cách sắp xếp, tính chất bát màu và nghĩ đến loại vi khuẩn, vi nấm gì.

• Không có vi khuẩn.

- **Nhuộm Ziehl Neelsen**

nh. • Phát hiện vi khuẩn AFB.

**4. Môi trường**

- Thạch máu.
- Thạch Socola.
- Thạch Mac Conkey.

**5. Nuôi cây theo phương pháp bán định lượng**

- Ria ở phần tư thứ 1.
- Đốt ăng rồi ria hai lần ở phần tư thứ 1, sau đó ria lui và tới đẻ cây sang phần tư thứ 2.
- Đốt ăng rồi ria hai lần ở phần tư thứ 2, sau đó ria lui và tới đẻ cây sang phần tư thứ 3.
- Đốt ăng rồi ria hai lần ở phần tư thứ 3, sau đó ria lui và tới đẻ cây sang phần tư thứ 4.
- Cây đậm một vài lần trên thạch máu.

**6. Điều kiện ủ ám**

- Nhiệt độ: 35 - 37°C.
- Khí trường:
  - 5 - 7% CO<sub>2</sub> (thạch máu và thạch socola)
  - Thường (thạch Mac Conkey)
- Thời gian: 16 - 18 giờ.

**7. Định danh vi khuẩn**

**7.1. Nhận định hình thái khuỷn lạc của từng loại vi khuẩn trên các loại môi trường:**

- Hình dạng.

- Kích thước.
- Màu sắc.
- Độ bóng, khô, mỡ.
- Bờ đều hay không đều.
- Tan máu.
- Mùi.

*7.2. Xác định các tính chất hóa sinh của vi khuẩn bằng các giá đường ngắn, máy định danh vi khuẩn tự động hoặc bộ API 20.*

## 8. Đọc kết quả

- Dương tính:
  - + Nuôi cây phát hiện và định danh được vi khuẩn, nấm gây bệnh.
  - + Đếm số lượng từng loại khuẩn lạc.
  - + Đánh giá số lượng vi khuẩn theo bảng.

Tiêu chuẩn	Thuật ngữ báo cáo	Định lượng (CFU/ml)
Mọc ở 1/4 đĩa thạch	1 +	< $10^4$
Mọc ở 2/4	2 +	$10^4$
Mọc ở 3/4	3 +	$10^5 - 10^6$
Mọc ở 4/4	4 +	< $10^6$

- Âm tính: không mọc vi khuẩn gây bệnh sau 48 giờ

## 9. Nhận định kết quả

### 9.1. Vi khuẩn thường trú

- *Staphylococci* coagulase (-).
- *Streptococci* α, β, γ.
- Trục khuẩn Gram (+) có nha bào (*Bacillus*).
- Trục khuẩn Gram (+) không có nha bào (*Corynebacterium*).
- *Neisseria* không gây bệnh.
- *Stomatococci*.
- *Micrococci*.
- Trục khuẩn Gram (-).

- *Candida* spp.

#### 9.2. Các vi khuẩn gây bệnh thường gặp

- *Moraxella catarrhalis*.
- *Haemophilus influenzae*.
- *Streptococcus pneumoniae*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Klebsiella pneumoniae*.

tổng

11)

Bài 16  
XÉT NGHIỆM CÁY DỊCH TY HÀU  
TÌM VI KHUẨN GÂY BỆNH

**Mục tiêu**

1. Thực hiện được các bước của kỹ thuật cây dịch ty hàn tìm vi khuẩn gây bệnh.
2. Tính được số lượng vi khuẩn có trong 1ml dịch ty hàn sau khi nuôi cây.

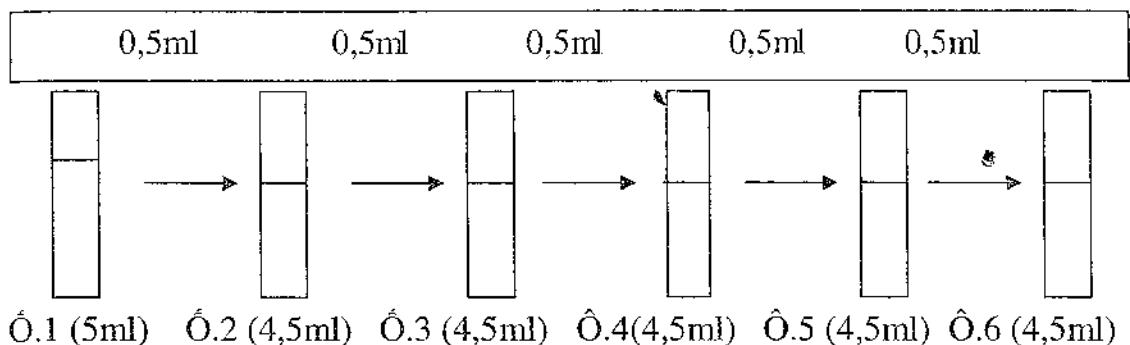
**1. Môi trường**

- Thạch máu
- Thạch Socola

**2. Cây đếm dịch ty hàn (theo Keizo Masumoto, Tsuyoshi Nagatake - Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Japan)**

- (1). Nhúng que tăm bông hoặc lấy 1 ống 100 µl (tương đương 0,1 ml) dịch ty hàn vào ống 5 ml dung dịch NaCl 0,9% tạo ống số 1 (có độ pha loãng tương ứng  $10^{-2}$ ).
- (2). Lấy 0,5 ml dung dịch ống số 1 cho sang ống số 2 chứa 4,5 ml NaCl 0,9% (có độ pha loãng tương đương  $10^{-3}$ ).
- (3). Lấy 0,5 ml dung dịch ống số 2 cho sang ống số 3 chứa 4,5 ml NaCl 0,9% (có độ pha loãng tương đương  $10^{-4}$ ).
- (4). Lấy 0,5 ml dung dịch ống số 3 cho sang ống số 4 chứa 4,5 ml NaCl 0,9% (có độ pha loãng tương đương  $10^{-5}$ ).
- (5). Lấy 0,5 ml dung dịch ống số 4 cho sang ống số 5 chứa 4,5 ml NaCl 0,9% (có độ pha loãng tương đương  $10^{-6}$ ).
- (6). Lấy 0,5 ml dung dịch ống số 5 cho sang ống số 6 chứa 4,5 ml NaCl 0,9% (có độ pha loãng tương đương  $10^{-7}$ ). Chú ý: Chỉ ống số 1 chứa 5 ml, từ ống số 2-6 đều chứa 4,5 ml dung dịch NaCl 0,9%.
- (7). Dùng que cây 10 µl cây các hỗn dịch đã pha loãng ở trên theo thứ tự từ ống số 6 đến ống số 1 vào 2 đĩa thạch máu và thạch sôcôla đã được chia làm 6 phần tương ứng (từ 6 đến 1). Chú ý: Không cần phải đốt lại ống khi cây chuyển từ hỗn dịch này sang hỗn dịch khác nếu cây từ ống số 6 đến ống số 1.

### Sơ đồ cấy đếm dịch ty hầu



### 3. Điều kiện ủ ám

- Nhiệt độ: 35 - 37°C.
- Khí trường: 5 - 7% CO<sub>2</sub>.
- Thời gian: 16 - 18 giờ.

### 4. Định danh vi khuẩn

#### 4.1. Nhận định hình thái khuẩn lạc của từng loại vi khuẩn trên các loại môi trường

- Hình dạng.
- Kích thước.
- Màu sắc.
- Độ bóng, khô, mỡ.
- Bờ đều hay không đều.
- Tan máu.
- Mùi.

#### 4.2. Nhuộm Gram để xác định hình thể, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn

#### 4.3. Xác định các tính chất hóa sinh của vi khuẩn bằng các giá đường ngắn, máy định danh vi khuẩn tự động hoặc bộ API 20.

### 5. Đọc kết quả

#### 5.1. Đếm số lượng khuẩn lạc

- Vùng 6 có độ pha loãng cuối cùng là 10<sup>9</sup>

- Vùng 5 có độ pha loãng cuối cùng là  $10^8$
- Vùng 4 có độ pha loãng cuối cùng là  $10^7$
- Vùng 3 có độ pha loãng cuối cùng là  $10^6$
- Vùng 2 có độ pha loãng cuối cùng là  $10^5$
- Vùng 1 có độ pha loãng cuối cùng là  $10^4$

### 5.3. Tính toán số lượng khuẩn lạc

- Vùng 6: Số lượng khuẩn lạc  $\times 10^7 \times 10^2 = SLKL \times 10^9$  CFU/ ml
- Vùng 5: Số lượng khuẩn lạc  $\times 10^6 \times 10^2 = SLKL \times 10^8$  CFU/ ml
- Vùng 4: Số lượng khuẩn lạc  $\times 10^5 \times 10^2 = SLKL \times 10^7$  CFU/ ml
- Vùng 3: Số lượng khuẩn lạc  $\times 10^4 \times 10^2 = SLKL \times 10^6$  CFU/ ml
- Vùng 2: Số lượng khuẩn lạc  $\times 10^3 \times 10^2 = SLKL \times 10^5$  CFU/ ml
- Vùng 1: Số lượng khuẩn lạc  $\times 10^2 \times 10^2 = SLKL \times 10^4$  CFU/ ml

## 6. Nhận định kết quả

### 6.1. Các vi khuẩn cư trú thông thường

- *Neisseria*
- *Corynebacterium*
- Trục khuẩn Gram (-)
- *Candida*
- Liên cầu tan máu beta
- *Micrococci*

### 6.2. Các vi khuẩn gây bệnh thường gặp

- *Moraxella catarralis*
- *H. influenzae*
- *S. aureus*
- *S. pneumoniae*
- *P. aeruginosa*
- *K. pneumoniae*
- *B. pseudomallei*
- *Corynebacterium*
- *Bordetella pertussis*
- *Legionella*

Bài 17  
**XÉT NGHIỆM**  
**CÁY NƯỚC TIỀU TÌM VI KHUẨN GÂY BỆNH**

**Mục tiêu**

1. Thực hiện được các bước của kỹ thuật cấy nước tiểu tìm vi khuẩn gây bệnh.
2. Đếm được số lượng vi khuẩn có trong 1ml nước tiểu sau khi nuôi cấy.

**1. Quan sát nước tiểu**

Màu sắc, độ trong đục, có máu... và ghi số

**2. Soi trực tiếp**

Nhuộm Gram nước tiểu không ly tâm: nếu có  $> 1$  VK/vi trường 100X thì kết luận số lượng vi khuẩn  $> 10^5$  CFU/ml.

**3. Môi trường**

- Thạch máu để cấy đếm nước tiểu không ly tâm.
- Thạch UriSelect 4 cấy đếm, đồng thời định danh sơ bộ vi khuẩn gây bệnh.

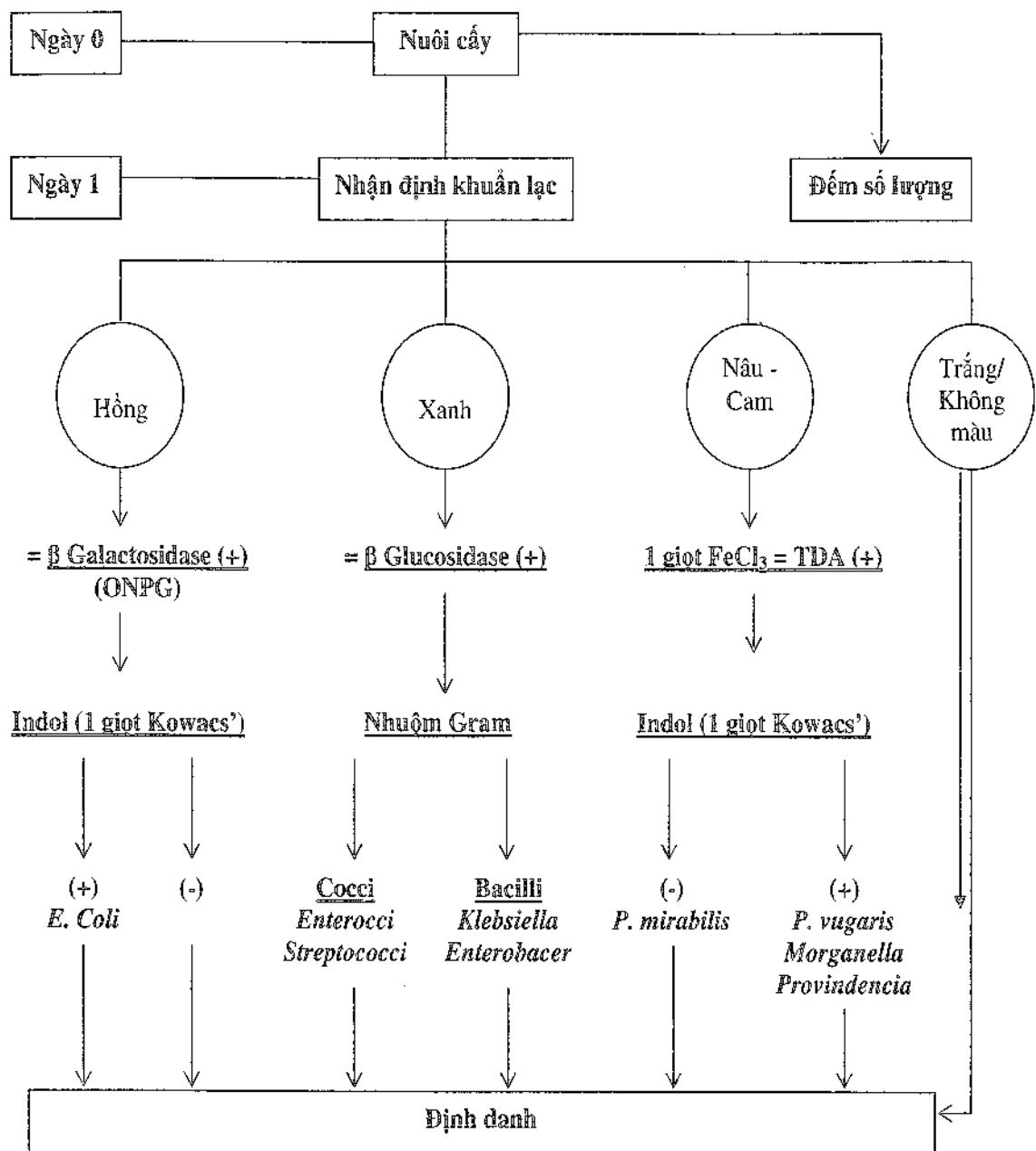
**4. Nuôi cấy**

*Ngày 0 - nuôi cấy:*

- Cấy đếm bằng que cấy định lượng 1 µl.
- Ủ ám 18-24 giờ/ 37°C/ khí trường O<sub>2</sub>.

*Ngày 1 - đếm số lượng khuẩn lạc:*

- Nhận định hình dạng, màu sắc từng loại khuẩn lạc.
- Đếm số lượng vi khuẩn/ 1ml nước tiểu. Nếu số lượng  $> 10^5$  VK/ ml thì chắc chắn có nhiễm khuẩn tiết niệu.
- Nhận định kết quả.



*Sơ đồ cấy đếm số lượng vi khuẩn trong nước tiểu  
trên môi trường Uri Select 4 (BIO-RAD)*

### 5. Điều kiện ủ ấm

- Nhiệt độ: 35 - 37°C.
- Khí trường: 5 - 7% CO<sub>2</sub> (thạch máu); Thường (thạch UriSelect 4).
- Thời gian: 16 - 18 giờ.

## 6. Định danh vi khuẩn

### 6.1. Nhận định hình thái khuẩn lạc của từng loại vi khuẩn:

- Hình dạng.
- Kích thước.
- Màu sắc.
- Độ bóng, khô, mỡ.
- Bờ đều hay không đều.
- Tan máu.
- Mùi.

### 6.2. Nhuộm Gram để xác định hình thể, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn

### 6.3. Xác định các tính chất hóa sinh của vi khuẩn bằng các giá đường ngắn, máy định danh vi khuẩn tự động hoặc bộ API 20.

### 6.4. Ngung kết với các kháng huyết thanh đa giá, đơn giá (*Salmonella*).

## 7. Đọc kết quả

### 7.1. Đếm số lượng từng loại khuẩn lạc

- Nếu số lượng  $>10^5$  CFU/1ml thì chắc chắn là vi khuẩn gây bệnh.
- Nếu số lượng  $<10^5$  CFU/1ml, kèm theo có BCĐN hoặc triệu chứng lâm sàng rõ thì nghĩ đến vi khuẩn gây bệnh.

### 7.2. Đánh giá số lượng vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm Gram giọt nước tiêu không ly tâm, soi dưới vật kính dầu

- Nếu có  $>1$  VK/ 1 vi trùng thì kết luận số lượng  $>10^5$  CFU/ ml.
- Nếu có  $>1$  BCĐN/ 1 vi trùng là có nhiễm trùng.
- Nếu có  $>5$  BCĐN/ 1 vi trùng là chắc chắn nhiễm trùng.

### 7.3. Lấy lại bệnh phẩm: nếu $\geq 3$ loại vi khuẩn thì coi là nhiễm bẩn.

### 7.4. Không cần đếm số lượng

- Lấy qua ống thông và chọc hút qua băng quang.
- Thạch máu chỉ bắt những khuẩn lạc nhỏ có hoặc không dung huyết.

## 8. Nhận định kết quả

### 8.1. Vi sinh vật cư trú thông thường

- *Staphylococci* không đông huyết tương.
- Liên cầu dung huyết  $\alpha$ ,  $\gamma$ .
- *Lactobacilli*.
- Trực khuẩn Gram dương không có nha bào.
- *Neisseria* không gây bệnh.
- Vi khuẩn khí khí (cầu khuẩn, Propionibacterium, cầu khuẩn và trực khuẩn Gram âm).
- *Mycobacterium*.
- *Mycoplasma*.
- Nấm men.

### 8.2. Vi sinh vật gây bệnh thường gặp

- Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Seratia*...).
- *Enterococci*.
- *Staphylococcus saprophyticus*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Candida albicans*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Mycobacterium tuberculosis*.
- *Gardnerella vaginalis*.
- Liên cầu dung huyết  $\beta$  (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*...).
- *Neisseria gonorrhoeae*.

### 8.3. Vi sinh vật gây bệnh ít gặp

- Vi khuẩn:
  - + Các vi khuẩn Gram dương
  - + Các vi khuẩn khí khí
  - + *Chlamydia*
  - + *Mycoplasma*
  - + *Leptospira*
- Ký sinh trùng. Sán máng (*Schistosoma*)
- Virus

**9. Nhận định nhiễm trùng tiết niệu theo triệu chứng lâm sàng**

Số lượng VK	BCDN	Triệu u chứng	Kết luận
Không mọc $<10^2$ CFU/ml	(-)	(-)	Không nhiễm khuẩn
		(+)	Chlamydia, CMV, Adenovirus typ 2, HSV: cấy dịch niệu đạo, dịch cổ tử cung, nước tiểu.
	(+) (-)	(+)	Mủ niệu vô khuẩn (mất nước...)
		(+)	- Hội chứng viêm niệu đạo (Chlamydia, Gonorrhoeae, Ureaplasma): cấy dịch niệu đạo, dịch cổ tử cung. - Bệnh nhân đang dùng kháng sinh
$\leq 10^2$ đến $< 10^5$ CFU/ml	(-)	(-)	- Chắc có sinh hoạt tình dục - Đặt ống thông tiểu
		(+)	- Chlamydia, Gonorrhoeae - Không có bằng chứng nhiễm trùng - Đang sử dụng kháng sinh
	(+) (-)	(+)	NKTN không điển hình. Đã sử dụng KS trước
		(+)	NKTN điển hình
$\geq 10^5$ CFU/ml	(-)	(-)	- NKTN không điển hình (có thai, người già), NK do sang chấn (catheter) - Sinh hoạt tình dục
		(+)	Viêm bàng quang, viêm thận
	(+) (-)	(+)	NKTN không điển hình (có thai, người già)
		(+)	Viêm bàng quang, viêm thận

## Bài 18

# XÉT NGHIỆM CÁY DỊCH NÃO TUÝ, CÁC CHẤT DỊCH TÌM VI KHUẨN GÂY BỆNH

### Mục tiêu

1. Thực hiện được các bước của kỹ thuật cấy dịch não tuỷ, cấy các chất dịch tìm vi khuẩn gây bệnh.
2. Mô tả được hình thể, cách sắp xếp và tính chất bắt màu của các loại vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm Gram căn dịch não tuỷ, các chất dịch sau khi ly tâm.

### 1. Quan sát đại thể

Nhận định số lượng, màu sắc, mức độ trong, đục, lẫn máu...

### 2. Xử lý bệnh phẩm

- Đέ láng, không lắc ống chứa dịch não tuỷ.
- Dùng pipette vô trùng hút dịch dưới đáy ống.
- Nhỏ 2-3 giọt lên từng môi trường nuôi cấy.
- Nhỏ 1-2 giọt lên lam kính để làm tiêu bản nhuộm Gram và AFB.

### 3. Soi trực tiếp

- Nhuộm Gram xem hình thể, cách sắp xếp, tính chất bắt màu và nghĩ đến loại vi khuẩn gì.
- Nhuộm xanh methylene phát hiện bạch cầu đa nhân (BCDN).
- Nhuộm Ziehl Neelsen phát hiện AFB (nếu nghi ngờ lao dịch não tuỷ thường có màu vàng chanh).

### 4. Môi trường nuôi cấy

- Thạch máu.
- Thạch Socola.

### 5. Điều kiện ủ ám

- Nhiệt độ: 35 - 37°C.

- Khí trường: 5 - 7% CO<sub>2</sub>.
- Thời gian: 16 - 18 giờ.

## 6. Định danh vi khuẩn

### 6.1. Nhận định hình thái khuẩn lạc của từng loại vi khuẩn:

- Hình dạng.
- Kích thước.
- Màu sắc.
- Độ bóng, khô, mờ.
- Bờ đều hay không đều.
- Tan máu.
- Mùi.

### 6.2. Nhuộm Gram xác định hình thể, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn.

### 6.3. Xác định các tính chất hóa sinh của vi khuẩn bằng các giá đường ngắn, máy định danh vi khuẩn tự động hoặc bộ API 20.

## 7. Đọc kết quả

- Dương tính: nuôi cấy phát hiện và định danh được vi khuẩn, nấm gây bệnh.
- Âm tính: không mọc vi khuẩn gây bệnh sau 48 giờ.

## Bài 19

# XÉT NGHIỆM SOI, CÁY DỊCH TIẾT ĐƯỜNG SINH DỤC TÌM VI SINH VẬT GÂY BỆNH

### Mục tiêu

1. Thực hiện kỹ thuật soi trực tiếp chất tiết đường sinh dục phát hiện *Neisseria gonorrhoeae* (cầu khuẩn lậu), *Gardernella vaginalis*, trùng roi, nấm men.
2. Thực hiện được các bước của kỹ thuật cây chất tiết đường sinh dục tìm vi khuẩn gây bệnh.

### 1. Bệnh phẩm

#### 1.1. Lấy bệnh phẩm

##### 1.1.1. Lấy chất tiết sinh dục ở nam giới

- Lấy vào buổi sáng trước khi đi tiểu. Dùng tăm bông vô trùng đưa sâu vào niệu đạo 2 – 3 cm, xoay tròn, để tăm bông 5 giây rồi rút ra.
- Dàn bệnh phẩm lên lam kính sạch và trong. Dàn đều và mỏng. Nên dùng 2 que tăm bông, 1 để soi trực tiếp, 1 để nuôi cấy.
  - Những BN mạn tính phải lấy bệnh phẩm vào lúc sáng sớm hoặc lấy tinh trùng để nuôi cấy.
  - Những BN nghi ngờ là đồng tính luyến ái thì lấy ở hậu môn và hầu họng.

##### 1.1.2. Lấy chất tiết sinh dục ở nữ giới

- Quan sát vị trí tổn thương: dùng mỏ vịt đưa sâu vào âm đạo, xoay ngang và mở rộng mỏ vịt để nhìn thấy cổ tử cung.
  - Bệnh phẩm chủ yếu được lấy ở niệu đạo và cổ tử cung, có thể lấy thêm ở hai tuyến Skene và hai tuyến Bartholin: dùng que cây hoặc tăm bông vô trùng đưa sâu vào cổ tử cung 2 - 3 cm, xoay tròn tăm bông và để trong đó 5 - 10 giây để cho dịch rỉ hoặc mủ ngâm vào tăm bông.

##### 1.1.3. Lấy dịch rỉ mắt ở trẻ sơ sinh

- Dùng ngón cái và ngón trỏ có đai găng tay ẩn vào hai mí mắt trẻ sơ sinh để mủ ở kết mạc sưng chảy ra.

- Dùng tăm bông vô trùng lấy mủ, chờ 5 - 10 giây để mủ ngấm vào tăm bông.

### **1.2. Vận chuyển và bảo quản**

Các vi khuẩn gây viêm nhiễm đường sinh dục thường rất dễ chết. Tốt nhất việc lấy bệnh phẩm phải thực hiện tại phòng xét nghiệm hoặc phải để trong môi trường bảo quản.

## **2. Soi trực tiếp**

### **2.1. *Trichomonas vaginalis* (Trùng roi âm đạo)**

*Trichomonas vaginalis* là một loại đơn bào ký sinh ở đường tiết niệu sinh dục, gây bệnh chủ yếu cho phụ nữ, đôi khi ở nam giới. Dịch tiết màu trắng đục, trong nhiều hay ít và khá lỏng. Trùng roi âm đạo gặp nhiều ở phụ nữ lứa tuổi sinh đẻ, ít gặp ở tuổi trẻ chưa dậy thì và phụ nữ ở tuổi mãn kinh.

Soi tươi là phương pháp chẩn đoán chủ yếu: Trùng roi hình quả mít, kích thước  $15-30 \times 7-10\mu\text{m}$ . Có 4 roi ở phía trước, 1 roi đi ra phía sau đến giữa thân tạo thành màng vây. Có 1 trực đi từ phía trước qua giữa thân ra khỏi thân giống như đuôi. Trùng roi chuyển động theo kiểu vừa xoay vừa lắc. Khi trùng roi chuyển động màng vây trông như làn sóng. Phát hiện những vi sinh vật tròn, trong có kích thước của một bạch cầu, di chuyển và quay tít.

### **2.2. *Candida***

*Candida* là một loại nấm men gây bệnh ở người. *Candida* sống hoại sinh trong khoang miệng, trong ruột, ở nếp nhăn của da, niêm mạc. Khi gặp điều kiện như cơ thể giảm sức đề kháng, người bị suy dinh dưỡng, dùng nhiều kháng sinh, phụ nữ có thai ... *Candida* từ trạng thái hoại sinh trở thành ký sinh gây bệnh.

- Bệnh phẩm viêm đường sinh dục do nấm thường thấy các dịch tiết đặc, màu trắng trong hay đổi khi màu vàng.

- Soi tươi: Dùng KOH 10 - 20% hoặc nước muối sinh lý *Candida* hình tròn hoặc bầu dục, đường kính  $2-5 \mu\text{m}$ , bào tử chồi, giả sợi nấm, sợi nấm thật.

- Nhuộm Gram: *Candida* hình tròn hoặc bầu dục, to, bắt màu Gram dương. Kích thước không đều, một vài cái có chồi. Không di động.

### 2.3. Vi khuẩn lậu (*Neisseria gonorrhoeae*)

- Nhuộm Gram: Vi khuẩn lậu hình cầu giống hạt cà phê, xếp thành đôi, bắt màu Gram (-). Đa số vi khuẩn lậu nằm trong bạch cầu đa nhân. Đây là tiêu chuẩn quan trọng chẩn đoán vi khuẩn lậu.
- Nhuộm đơn: quan sát bạch cầu đa nhân.

### 2.4. *Gardnerella vaginalis*

*G. vaginalis* trước kia được gọi là *Haemophilus vaginalis* hoặc *Corynebacterium vaginalis*, hình cầu trực khuẩn, bắt màu Gram thay đổi. Nhuộm Gram từ bệnh phẩm, vi khuẩn bắt màu không rõ. Nhuộm Gram từ khuẩn lạc, vi khuẩn bắt màu Gram âm. *G. vaginalis* có trong vi hệ bình thường của âm đạo. Tuy nhiên có thể phân lập được *G. vaginalis* ở 20 - 40% phụ nữ có hội chứng viêm đường tiết niệu sinh dục.

Chẩn đoán phòng xét nghiệm:

- pH âm đạo: > 4,8
  - Soi tươi: số lượng vi khuẩn và tế bào viêm nhiều.
  - Nhuộm Gram: Không có hoặc rất ít Lactobacilli. *G. vaginalis* hình cầu trực khuẩn, Gram (-).
  - Tế bào Clue “Clue cell”: là tế bào biểu mô âm đạo bị bao phủ bởi rất nhiều vi khuẩn (chủ yếu là *Gardnerella vaginalis*) tập trung dày đặc, đến mức bờ của tế bào không rõ, chiếm trên 20% tế bào biểu mô. Có giá trị cao trong chẩn đoán nhiễm khuẩn âm đạo.
  - Thử nghiệm Sniff (+): cho tăm bông có bệnh phẩm vào ống nghiệm chứa 1,5 ml dung dịch KOH 7%. Trộn đều, ngửi sau 5 phút. Nếu có mùi tanh cá uơn là thử nghiệm dương tính, có nhiễm trùng do *G. vaginalis*. Không có mùi là thử nghiệm âm tính.
- ### 2.5. *Haemophilus ducreyi*
- Nhuộm Gram nhưng rất khó quan sát hình thể vi khuẩn. Thường nhuộm xanh methylen hoặc nhuộm Giemsa. *Haemophilus ducreyi* hình cầu trực khuẩn, bắt màu Gram (-) có hai cực, xếp thành chuỗi.
  - Nạo sảng hạ cam và cho vào vài giọt nước cát vô trùng. Nhỏ bệnh phẩm vào 1 ml huyết thanh thỏ hoặc người, ủ ấm 35°C/ 24 -72 giờ, sau đó dùng que cấy lấy từ đáy ống, dàn tiêu bản nhuộm Gram hoặc nhuộm xanh methylen.

- Kết quả: *H. ducreyi* hình trực khuẩn Gram âm có hai cực, xếp thành chuỗi như "xích xe đạp".

### 3. Nuôi cây

#### 3.1. Tiêu chuẩn bệnh phẩm

Các vi sinh vật gây bệnh đường sinh dục khi ra ngoài môi trường rất dễ chết vì vậy bệnh phẩm để nuôi cây sau khi lấy phải được gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt. Hoặc trong vòng 6 tiếng phải được bảo quản trong môi trường vận chuyển. Không được bảo quản trong tủ lạnh.

#### 3.2. Xử lý bệnh phẩm

Đỗ canh thang vào ống chứa que tăm bông bệnh phẩm. Lắc kỹ ống. Ria cây que tăm bông lên thạch máu và thạch Socola. Sau đó phết 2 lam kính làm tiêu bản nhuộm Gram và nhuộm xanh Methylen.

#### 3.3. Môi trường nuôi cây và điều kiện ủ ấm

- Thạch máu: ủ ấm 35-37°C, khí trào O<sub>2</sub>, qua đêm.
- Thạch Socola: ủ ấm 35-37°C, khí trào 5-7% CO<sub>2</sub>, qua đêm.
- Thạch Sabouraud: ủ ấm 30-35°C, khí trào O<sub>2</sub>, qua đêm.

#### 3.4. Định danh vi khuẩn

##### 3.4.1. Nhận định hình thái khuẩn lạc của từng loại vi khuẩn:

- Hình dạng.
- Kích thước.
- Màu sắc.
- Độ bóng, khô, mỡ.
- Bờ đều hay không đều.
- Tan máu.
- Mùi.

##### 3.4.2. Nhuộm Gram xác định hình thể, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn.

##### 3.4.3. Xác định các tính chất hóa sinh của vi khuẩn bằng các giá đường ngắn, máy định danh vi khuẩn tự động hoặc bộ API 20.

#### 3.5. Đọc kết quả

- Dương tính: nuôi cây phát hiện và định danh được vi khuẩn, nấm gây bệnh.
- Âm tính: không mọc vi khuẩn gây bệnh sau 48 giờ.

## 4. Nhận định kết quả

### 4.1. Vi sinh vật thường trú

#### Vi khuẩn

- Các vi khuẩn kỵ khí (Các cầu khuẩn kỵ khí, *Bacteroides* spp., *Fusobacteria*, *Lactobacilli*, *Propionibacteria*).

- *Corynebacteria*.
- *Enterobacteriaceae*.
- *Staphylococci* coagulase (-).
- *Streptococci*.

#### Nấm men

- *Candida* spp.

### 4.2. Vi sinh vật gây bệnh thường gặp

Tất cả các vi khuẩn mọc với số lượng nhiều, nuôi cấy thuận đều được định danh vi khuẩn.

#### Vi khuẩn

- *Neisseria gonorrhoeae*.
- Liên cầu nhóm B.
- Liên cầu nhóm D.
- *Gardnerella vaginalis*.
- *Haemophilus ducreyi*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Enterococci*.
- *Enterobacteriaceae*.
- *Pseudomonas* spp.
- *Chlamydia trachomatis*.
- *Mycoplasma hominis*.
- *Treponema pallidum*.

#### Nấm men

- *Candida albicans*.
- Các loại nấm men khác.

## Bài 20

# NUÔI CÂY, PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH

## PSEUDOMONAS AERUGINOSA (TRỰC KHUẨN MỦ XANH)

P.,

### Mục tiêu

1. Trình bày được các tiêu chuẩn định danh *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Thực hiện được kỹ thuật định danh *Pseudomonas aeruginosa*.

### 1. Giới thiệu

*Pseudomonas aeruginosa* có khả năng gây bệnh ở nhiều cơ quan và nhiễm khuẩn bệnh viện. *Pseudomonas aeruginosa* thường tồn tại lâu trong môi trường bệnh viện như nước rửa, nền nhà, bàn tay nhân viên y tế.

*Pseudomonas aeruginosa* thường gây nhiễm khuẩn có mủ ở vết thương, từ đó vi khuẩn có thể xâm nhập vào máu gây nhiễm khuẩn huyết. Ngoài ra, chúng có thể gây viêm đường tiết niệu, viêm đường hô hấp, gây nhiễm khuẩn trong tổ chức ghép, đặc biệt sau thủ thuật can thiệp như nội soi, catheter, nội khí quản, ống dẫn lưu...

Nhiễm khuẩn do *Pseudomonas aeruginosa* khó điều trị do vi khuẩn đã kháng kháng sinh. Nhiễm khuẩn huyết do *Pseudomonas aeruginosa* tỷ lệ tử vong cao.

### 2. Hình thể và tính chất bắt màu

*Pseudomonas aeruginosa* là những trực khuẩn, bắt màu Gram âm, mảnh, thẳng hoặc hơi cong, hai đầu tròn, kích thước  $0,5-1,0 \times 1,5-3\mu\text{m}$ , di động nhờ một lông ở một đầu, không sinh nha bào, có pili ở cực (rộng 6nm).

### 3. Nuôi cây, phân lập

#### 3.1. Môi trường

Trực khuẩn mủ xanh phát triển dễ dàng trên các môi trường thông thường như thạch thường, thạch máu, Mac Conkey.

#### 3.2. Điều kiện ủ ấm

-Khí trường: *Pseudomonas aeruginosa* thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí tuyệt đối, có thể ủ ở điều kiện khí thường.

-Nhiệt độ: Có thể phát triển ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$  -  $41^{\circ}\text{C}$ , nhưng thích hợp nhất là  $37^{\circ}\text{C}$ , ưa pH trung tính.

-Thời gian ủ ám: 12-24 giờ.

### 3.3. Hình thái khuẩn lạc

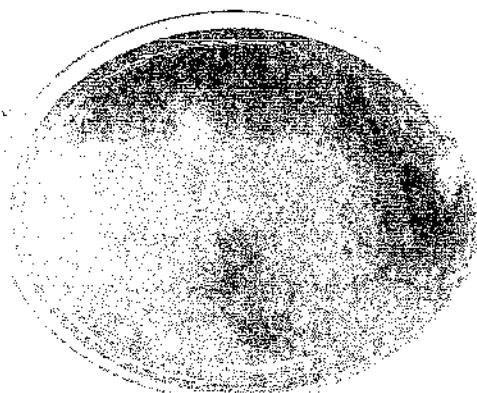
- Trong canh thang: trực khuẩn mù xanh mọc làm đục đều môi trường sau 24 giờ và tạo váng bè mặt sau 48 giờ.

- Trên thạch máu, thạch thường: Có thể hình thành các ba dạng khuẩn lạc.

+ Khuẩn lạc dạng S: đường kính 1-2 mm, tròn, trơn, hơi lồi sau 18-24h, có thể tan máu beta, có ánh kim, có sác tố xanh lục, có mùi thơm đặc biệt như mùi nho.

+ Khuẩn lạc dạng R: đường kính nhỏ hơn, thô ráp, lồi, thường phân lập được từ ngoại cảnh.

+ Khuẩn lạc dạng M: khuẩn lạc dạng nhầy, tan máu beta.



Hình 22. *Pseudomonas aeruginosa* sinh sắc tố trên thạch thường

### 3.4. Tính chất sinh sắc tố:

Trực khuẩn mù xanh có thể tiết bốn loại sắc tố:

- Pyocyanin: là sắc tố phenazin, có màu xanh da trời, tan trong nước và tan trong clorofuc, 96% *P. aeruginosa* sinh sắc tố này. Pyocyanin sinh ra thuận lợi trong môi trường tiếp xúc nhiều với không khí, dễ dàng phát hiện khi nuôi vi khuẩn trên môi trường canh thang, thạch thường hoặc dùng môi trường King A để phát hiện sinh sắc tố. Chỉ có *P. aeruginosa* sinh sắc tố pyocyanin.

- Pyoverdin (còn gọi là fluorescent): sắc tố có màu xanh lục, tan trong nước, nhưng không tan trong clorofoc. Dùng môi trường King B để phát hiện sắc tố này. Ngoài *P. aeruginosa* còn có các vi khuẩn khác sinh pyoverdin là *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteili* cũng có khả năng sinh sắc tố này.

- Pyorubrin: sắc tố màu hồng nhạt, chỉ 1% số chủng *P. aeruginosa* sinh ra sắc tố này.

- Pyomelanin: sắc tố màu nâu đen, chỉ 1-2% số chủng *P. aeruginosa* sinh sắc tố này.

Tuy nhiên không phải tất cả các *P. aeruginosa* đều sinh sắc tố, khoảng 5-10% số chủng *P. aeruginosa* không sinh sắc tố.

#### 4. Tính chất hoá sinh chính

- Oxydase (+) (trong vòng 10 giây)
- Di động (+), hiếu khí bề mặt
- Sử dụng glucose và các đường khác theo hình thức “oxy hóa”
- Không sử dụng glucose và các đường khác bằng hình thức lên men.
- Phản ứng (+): Di động (hiếu khí bề mặt), citrate cimmons, acetamid, ADH.
- Phản ứng (-): Indol, Urease (-/+), H<sub>2</sub>S, ONPG, LDC, ODC.
- Có khả năng mọc ở 42°C

#### 5. Chẩn đoán phân biệt với *P. fluorescens* và *P. putida*:

- Pyocyanin (-); Không có khả năng mọc ở mọc 42°C; Không khử NO<sub>3</sub> thành NO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> thành NO.
- Có khả năng mọc ở 4°C.

Bài 21  
NUÔI CÁY, PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH  
*ACINETOBACTER BAUMANNII*

**Mục tiêu**

1. Trình bày được các tiêu chuẩn định danh *Acinetobacter baumannii*.
2. Thực hiện được kỹ thuật định danh *Acinetobacter baumannii*.

**1. Giới thiệu**

*Acinetobacter baumannii* là cầu trực khuẩn, bắt màu Gram âm. Chúng thường tồn tại ở các môi trường ẩm uột trong bệnh viện và là căn nguyên chính gây nhiễm trùng bệnh viện, đặc biệt ở các khoa Hồi sức tích cực. Ngoài ra, *A. baumannii* còn gây các nhiễm trùng khác ở người như viêm phổi, viêm nội tâm mạc, nhiễm trùng da và vết thương, viêm phúc mạc, nhiễm trùng tiết niệu, viêm kết mạc, viêm xương tuỷ.

Hiện nay, *A. baumannii* thường đề kháng với nhiều loại kháng sinh, kể cả các kháng sinh cephalosporin thế hệ 3 và carbapenem làm cho việc điều trị hết sức khó khăn.

**2. Hình thể và tính chất bắt màu**

*Acinetobacter baumannii* là những cầu trực khuẩn, bắt màu Gram âm, không di động.

**3. Nuôi cây, phân lập**

**3.1. Môi trường**

*Acinetobacter baumannii* phát triển dễ dàng trên các môi trường nuôi cây thông thường như thạch thường, thạch máu.

**3.2. Điều kiện ủ ám**

- Khí trường: *Acinetobacter baumannii* là vi khuẩn hiếu khí tuyệt đối, có thể ủ ở điều kiện khí trường thường.

- Nhiệt độ: Có thể phát triển ở nhiệt độ  $20^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ , nhưng nhiệt độ tối ưu là  $35 - 37^{\circ}\text{C}$ . Một số loài có thể phát triển được ở  $41^{\circ}\text{C}$  và  $44^{\circ}\text{C}$ .
- Thời gian ủ ấm: 12-24 giờ.

### 3.3. Hình thái khuẩn lạc

Trên thạch máu, thạch thường: *A. baumannii* thường có khuẩn lạc dạng S, nhày, mờ, đường kính 2-3 mm, sắc tố màu trắng xám. Khuẩn lạc của *A. baumannii* tương tự *K. pneumoniae* nhưng kích thước thường lớn hơn.



**Hình 23. Khuẩn lạc của *Acinetobacter baumannii* trên môi trường thạch máu**

### 4. Tính chất hóa sinh chính

- Phản ứng [-]: Oxidase; Di động; Khử nitrate thành nitrite.
- Phản ứng [+]: Catalase; Mọc trên Mac Conkey; Sử dụng glucose bằng hình thức lên men và oxy hoá; Lên men đường Lactose; Hiếu khí bề mặt; Mọc ở nhiệt độ cao ( $44^{\circ}\text{C}$ ).

Bài 22

**NUÔI CẤY, PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH**

**ENTEROBACTERIACEAE (HỘ TRỰC KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT)**

**Mục tiêu**

1. Trình bày được tiêu chuẩn chẩn đoán các vi khuẩn thuộc họ trực khuẩn đường ruột Enterobacteriaceae.
2. Thực hiện được các bước định danh *E. coli*, *K. pneumoniae*.
3. Chẩn đoán phân biệt được các trực khuẩn đường ruột Enterobacteriaceae.

**1. Giới thiệu**

*Enterobacteriaceae* (Hộ trực khuẩn đường ruột) là một họ lớn, phác tạp. Chúng có khả năng gây bệnh ở nhiều cơ quan như tiêu hoá, tiết niệu, hô hấp... và nhiễm khuẩn huyết. Các trực khuẩn đường ruột gây bệnh quan trọng là *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Proteus* ...

Hiện nay đa số các trực khuẩn đường ruột có khả năng sinh men  $\beta$  - lactamase phổ mở rộng (ESBL: Extended spectrum beta-lactamase) để kháng với nhiều loại kháng sinh, kể cả các cephalosporin thế hệ 3 làm cho việc điều trị hết sức khó khăn. Điều trị chủ yếu dựa vào kháng sinh đồ.

*Enterobacteriaceae* có nhiều đặc điểm chung như:

- (1). Là các trực khuẩn.
- (2). Bất màu Gram (-).
- (3). Di động (nếu di động thường có lông xung quanh thân) hoặc không di động (không có lông).
- (4). Hiếu khí hoặc kỵ khí tùy tiện.
- (5). Phát triển tốt trên các môi trường nuôi cấy thông thường.
- (6). Sử dụng glucose bằng hình thức lên men.
- (7). Phân giải nitrat thành nitrit.
- (8). Oxydase (-).

## 2. Hình thể và tính chất bắt màu

*Enterobacteriaceae* là trực khuẩn bắt màu Gram âm, hầu hết có lông, một số ít chủng có vỏ.

## 3. Nuôi cấy, phân lập

### 3.1. Môi trường

Phát triển dễ dàng trên các môi trường nuôi cấy thông thường (thạch thường, thạch máu...), kể cả môi trường có mật (Mac Conkey, SS...).

### 3.2. Điều kiện ủ ám

- Khí trường: *Enterobacteriaceae* thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí tuỳ tiện, có thể ủ ở điều kiện khí trào thường hoặc khí trào 5% CO<sub>2</sub>.
- Nhiệt độ: có khả năng phát triển ở 44°C và nhiệt độ tối ưu là 35-37°C
- Thời gian ủ ám: 12-24 giờ.

### 3.3. Hình thái khuẩn lạc

Trên môi trường thạch máu *Enterobacteriaceae* thường có khuẩn lạc dạng S, đường kính 1-2 mm, sắc tố màu trắng hoặc vàng, có thể tan máu β hoặc không tan máu.

## 4. Tính chất hóa sinh chính

- Phản ứng [+]: Sử dụng glucose bằng hình thức lên men; Phân giải nitrat thành nitrit
- Phản ứng [-]: Oxidase

## 5. Định danh *E. coli*

### 5.1. Nhuộm Gram:

Trực khuẩn, bắt màu Gram (-), đa số di động.

### 5.2. Hình thái khuẩn lạc:

- Trên môi trường thạch máu *E. coli* thường có khuẩn lạc dạng S, đường kính 2 mm, sắc tố màu trắng trong hoặc đục, có thể tan máu β hoặc không tan máu.
- Trên môi trường DCA, SS, Mac Conkey khuẩn lạc đỗ dò lên men lactose.

### **5.3. Tính chất sinh vật học chính:**

- Có tính chất chung của họ *Enterobacteriaceae*: Oxydase (-); Glucose (+); Khử NO<sub>3</sub> thành NO<sub>2</sub>.
- Phản ứng [+]: lên men manit, saccarose, lactose; Indol; RM; Sinh hơi; Di động.
- Phản ứng [-]: VP; Citrate; H<sub>2</sub>S.

### **5.4. Chẩn đoán phân biệt**

- *Shigella*
- *Citrobacter*
- *Edwardsiella tarda*

## **6. Chẩn đoán *K. pneumoniae***

### **6.1. Nhuộm Gram:**

Trục khuẩn Gram (-), thường đứng thành đôi, không di động, có vỏ dày (kích thước có thể gấp 2-3 lần tế bào vi khuẩn).

### **6.2. Hình thái khuẩn lạc:**

- Trên môi trường thạch máu *K. pneumoniae* thường có khuẩn lạc dạng S, nhầy, mờ, đường kính 2 mm, sắc tố màu trắng đục, có thể tan máu β hoặc không tan máu.
- Trên môi trường DCA, SS, Mac Conkey khuẩn lạc hồng do lên men lactose.

### **6.3. Tính chất sinh vật học chính:**

- Có tính chất chung của họ *Enterobacteriaceae*: Oxydase (-); Glucose (+); Khử NO<sub>3</sub> thành NO<sub>2</sub>.
- Phản ứng [+]: Lên men glucose và nhiều loại đường khác, đa số các chủng lên men đường lactose; Đò methyl; Indol; Sinh hơi.
- Phản ứng [-]: Citrat; Urea; Di động; H<sub>2</sub>S.

*Bảng 1. Tính chất hoá sinh của các vi khuẩn họ Enterobacteriaceae*

<i>Loài (Species)</i>	<i>Lactose</i>	<i>Glucose</i>	<i>Sinh hói</i>	<i>H<sub>2</sub>S</i>	<i>Di động</i>	<i>Urea</i>	<i>Indol</i>	<i>Citrat</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	(+/-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(+)
<i>Citrobacter diversus</i>	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+/-)	(+)	(+)
<i>Escherichia coli</i>	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
<i>Shigella dysenteriae</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)
<i>Shigella flexneri</i>	(-)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)
<i>Shigella boydii</i>	(-)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)
<i>Shigella sonnei</i>	(+/-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Salmonella paratyphi B,C</i>	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Salmonella paratyphi A</i>	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>Salmonella typhi</i>	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>Salmonella arizona</i>	(+/-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(+)	(+)	(++)	(-)	(-)	(+)	(+/-)	(+)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(+)	(+)	(++)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(+)	(+)	(++)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Serratia marcescens</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Serratia liquefaciens</i>	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Morganella morganii</i>	(-)	(+)	(+/-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
<i>Proteus mirabilis</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(-)	(-)
<i>Proteus vulgaris</i>	(-)	(+)	(+/-)	(+)	(++)	(+)	(+)	(-)

## Bài 23

# NUÔI CÁY, PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH *SALMONELLA*

### Mục tiêu

1. Trình bày được các tiêu chuẩn chẩn đoán các trực khuẩn *Salmonella*.
2. Thực hiện được các bước định danh *Salmonella typhi*.
3. Chẩn đoán phân biệt được các trực khuẩn *Salmonella* khác.

### 1. Giới thiệu

*Salmonella* là những trực khuẩn Gram (-), nói chung di động, thuộc họ *Enterobacteriaceae* (họ các trực khuẩn đường ruột) nên có các tính chất chung của họ này. Có 2 loại *Salmonella* thường gây bệnh ở người:

- *Salmonella* gây bệnh thương hàn: *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C*. Các *Salmonella* này chỉ gây bệnh cho người.
- *Salmonella* gây nhiễm khuẩn nhiễm độc thức ăn: *S. enteritidis*, *S. typhimurium*... Các *Salmonella* này vừa gây bệnh cho người, vừa gây bệnh cho động vật.

Từ năm 1995, ở Việt Nam đã xuất hiện nhiều ổ dịch thương hàn do các chủng *S. typhi* đa kháng kháng sinh như chloramphenicol, tetracyclin, ampicilin và co-trimoxazol làm cho việc điều trị hết sức khó khăn.

### 2. Hình thể và tính chất bắt màu

*Salmonella* là những trực khuẩn bắt màu Gram âm, kích thước trung bình  $2-3 \times 0,5-1\mu\text{m}$ . Vì khuẩn di động, có nhiều lông xung quanh thân (trừ *S. gallinarum* và *S. pullorum*), không sinh nha bào, không có vỏ.

### 3. Nuôi cấy, phân lập

#### 3.1. Môi trường nuôi cấy

- Canh thang selenite: là môi trường tăng sinh cho *Salmonella*.
- Môi trường Mac Conkey là môi trường phân lập ít chọn lọc cho các vi khuẩn họ đường ruột *Enterobacteriaceae* nên có thể sử dụng để cấy phân:

- Muối mật và thuốc nhuộm (crystal violet) có tác dụng úc chế các vi khuẩn Gram (+) và một số vi khuẩn Gram (-) khó mọc.

- Úc chế sự lan của *Proteus*.

- Sự lên men đường lactose sẽ được phát hiện bằng chỉ thị màu đỏ trung tính khi pH < 6,8. Vi khuẩn lên men đường lactose khuẩn lạc sẽ có màu đỏ, lên men đường lactose chậm sẽ có màu hồng.

- DCA (Desoxycholate-Citrate-Agar), SS (Salmonella-Shigella) là môi trường phân lập chọn lọc cao cho các vi khuẩn đường ruột, ưu tiên cho *Salmonella* và *Shigella* phát triển nên thường được sử dụng để cấy phân:

- Muối mật (sodium desoxycholate) hoặc thuốc nhuộm với nồng độ cao có tác dụng úc chế các vi khuẩn Gram (+) và một số vi khuẩn Gram (-) khó mọc, ưu tiên cho *Salmonella* và *Shigella* phát triển.

- Úc chế sự lan của *Proteus*.

- Sự lên men đường được phát hiện bằng chỉ thị màu trung tính.

- Sodium thiosulfat là nguồn sulfur, vi khuẩn sinh H<sub>2</sub>S sẽ có sắc tố đen.

### 3.2. Điều kiện ủ ám

- Khí trường: *Salmonella* là vi khuẩn hiếu khí tùy tiện

- Nhiệt độ: có thể phát triển ở nhiệt độ 6-42°C. Nhiệt độ tối ưu là 37°C.

- Thời gian ủ ám: 18-24 giờ.

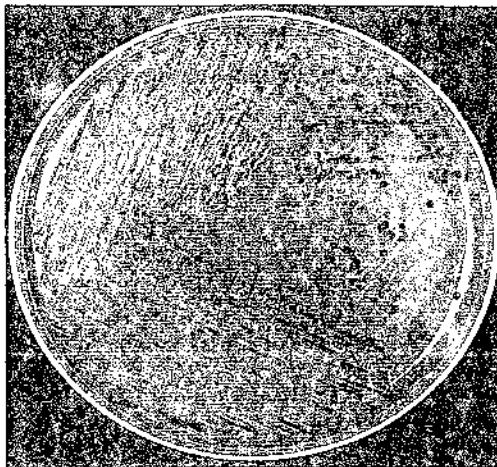
### 3.3. Hình thái khuẩn lạc

- Trên môi trường lỏng, sau 5-6 giờ nuôi cấy, vi khuẩn đục nhẹ và sau 18 giờ môi trường đục đều.

- Trên môi trường thạch thường, khuẩn lạc tròn, lồi, bóng, không màu hoặc màu trắng xám.

- Trên môi trường Mac Conkey: khuẩn lạc trong suốt, hơi hồng do không lên men lactose.

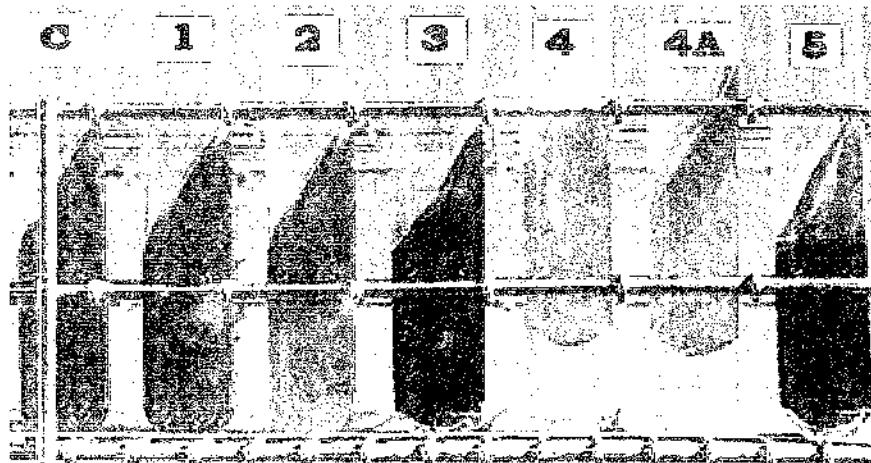
- Trên môi trường có chất úc chế chọn lọc như DCA, SS: khuẩn lạc trong suốt, hơi hồng do không lên men lactose. Nếu sinh H<sub>2</sub>S ở giữa khuẩn lạc có núm đen.



*Hình 24. Khuẩn lạc Salmonella có núm đen do sinh H<sub>2</sub>S trên môi trường SS*

### 3.4. Tính chất sinh vật học chính

*Salmonella* thuộc họ các trực khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae* nên có các tính chất chung của họ này là oxydase (-), glucose (+).



*Hình 25. Salmonella sinh H<sub>2</sub>S (óng số 3) trên môi trường Kligler*

Ngoài ra còn có một số tính chất đặc trưng cho loài như:

- Lên men đường manit, sorbitol (+)
- Không lên men đường lactose, sucrose, salicin, inositol (-)
- Phản ứng (+): RM, citrate simmons (trừ *S. typhi*), di động, sinh hơi (trừ *S. typhi*), H<sub>2</sub>S (trừ *S. paratyphi* A), lysindecacboxylase (LDC) (trừ *S. paratyphi* A).
- Phản ứng (-): VP, ONPG, indol, urease, lipase, deoxyribonuclease (ODC).

*Trên môi trường Kligler: phần tù màu vàng do lên men glucose, có thể đen do sinh H<sub>2</sub>S (trừ *S. paratyphi A*, *S. typhi* có vết đen). Phần nghiêng có màu đỏ do không lên men lactose.*

Tuy nhiên, không phải bất kỳ *Salmonella* nào cũng có đầy đủ những tính chất trên.

**Bảng 1. Công thức kháng nguyên của một số typ huyết thanh *Salmonella* theo sơ đồ của Kauffman và White**

Nhóm	Serotyp	Kháng nguyên thân (O)	Kháng nguyên lông (H)	
			Pha 1	Pha 2
A	<i>Salmonella group A</i>	2		
	<i>Salmonella paratyphi A</i>	1, 2, 12	a	
B	<i>Salmonella group B</i>	4		
	<i>Salmonella paratyphi B</i>	1, 4, 5, 12	b	1, 2
C1	<i>Salmonella typhimurium</i>	1, 4, 5, 12	i	1, 2
	<i>Salmonella group C1</i>	6, 7		
C2	<i>Salmonella paratyphi C</i>	6, 7, Vi	c	1, 5
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	6, 7	c	1, 5
D	<i>Salmonella group C2</i>	8		
	<i>Salmonella group D</i>	9		
E	<i>Salmonella typhi</i>	9, 12, Vi	c, d	
	<i>Salmonella enteritidis</i>	1, 9, 12	m	
E	<i>Salmonella group E</i>	3, 10, 15, 19		

#### 4. Chẩn đoán xác định

Các *Salmonella* có hai loại kháng nguyên chính là kháng nguyên thân (kháng nguyên O) và kháng nguyên lông (kháng nguyên H). Một số chủng còn có kháng nguyên bề mặt (kháng nguyên Vi). Dựa trên kháng nguyên O, Vi và H, Kauffman và White đã chia loài *Salmonella* thành nhiều typ huyết thanh khác nhau. Hiện nay người ta đã phát hiện ra trên 2.200 typ huyết thanh.

Để khẳng định typ huyết thanh của *Salmonella* phải tiến hành ngưng kết *Salmonella* với các kháng huyết thanh đa giá, đơn giá.

## 5. Chẩn đoán phân biệt

- *Citrobacter spp.*
  - + LDH (-).
  - + H<sub>2</sub>S (-).
  - + Indol (+).
  - + Không ngưng kết với kháng huyết thanh *Salmonella*.
- *Proteus spp.*
  - + Không ngưng kết với kháng huyết thanh *Salmonella*.

## Bài 24

# NUÔI CÂY, PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH SHIGELLA

### Mục tiêu

1. Trình bày được tiêu chuẩn chẩn đoán các trực khuẩn *Shigella*.
2. Thực hiện được các bước định danh *Shigella flexneri*
3. Chẩn đoán phân biệt được các trực khuẩn *Shigella* khác.

### 1. Giới thiệu

*Shigella* là những trực khuẩn Gram (-), không di động (khác với *Salmonella*), không có vỏ, hô hấp hiếu khí hoặc kỵ khí. *Shigella* không di động, không lên men lactose.

Dựa vào kháng nguyên thân O và các tính chất sinh vật hoá học *Shigella* được chia thành 4 nhóm:

- Nhóm A: *S. dysenteriae* (có 10 typ huyết thanh ; *S. shiga* có 1 typ huyết thanh).
- Nhóm B: *S. flexneri* (có 6 typ huyết thanh chính và 6 typ huyết thanh phụ).
- Nhóm C: *S. boydii* (có 15 typ huyết thanh).
- Nhóm D: *S. sonnei* (chỉ có 1 typ huyết thanh).

*Shigella* thường gây ra hội chứng lỵ trong cộng đồng ở mọi lứa tuổi, đặc biệt là trẻ em. *Shigella* gây bệnh chủ yếu là *S. flexneri*, *S. sonnei*.

*Shigella* là trực khuẩn đường ruột kháng lại kháng sinh mạnh nhất qua trung gian plasmid. Hiện nay, *Shigella* đa đẻ kháng với các kháng sinh tetracyclin, chloramphenicol, ampicyclin, co-trimoxazol đang là vấn đề ở Việt Nam cũng như nhiều nước tại khu vực Tây Thái bình dương. Quynolone là những kháng sinh thay thế có hiệu quả, tuy nhiên đã xuất hiện các chủng *Shigella* kháng nalidixic acid.

### 2. Hình thể và tính chất bắt màu

*Shigella* là trực khuẩn nhỏ, bắt màu Gram âm, kích thước khoảng 1-3 µm, không di động, không có lông, không sinh nha bào, không có vỏ.

### 3. Nuôi cấy, phân lập

#### 3.1. Môi trường

*Shigella* phát triển được trên các môi trường nuôi cấy thông thường. Môi trường thường sử dụng để phân lập *Shigella* từ bệnh phẩm phân là MacConkey, SS (Salmonella-Shigella), DCA (Desoxycholate citrat agar).

- MacConkey là môi trường phân lập ít chọn lọc cho các vi khuẩn họ đường ruột *Enterobacteriaceae* nên có thể sử dụng để cấy phân:

- + Muối mật và thuốc nhuộm (crystal violet) có tác dụng ức chế các vi khuẩn Gram (+) và một số vi khuẩn Gram (-) khó mọc. Ức chế sự mọc lan của *Proteus*.
- + Sự lên men đường lactose sẽ được phát hiện bằng chỉ thị màu đỏ trung tính khi pH < 6,8. Vi khuẩn lên men đường lactose khuẩn lạc sẽ có màu đỏ, lên men đường lactose chậm sẽ có màu hồng.

- DCA (Desoxycholate-Citrate-Agar), SS (Salmonella-Shigella) là những môi trường phân lập chọn lọc cao cho các trực khuẩn Gram (-) đường ruột, ưu tiên cho *Salmonella* và *Shigella* phát triển nên thường được sử dụng để cấy phân:

- + Muối mật (sodium desoxycholate) hoặc thuốc nhuộm với nồng độ cao có tác dụng ức chế các vi khuẩn Gram (+) và một số vi khuẩn Gram (-) khó mọc, ưu tiên cho *Salmonella* và *Shigella* phát triển và ức chế sự lan của *Proteus*.
- + Sự lên men đường được phát hiện bằng chỉ thị màu trung tính.
- + Sodium thiosulfat là nguồn sulfur, vi khuẩn sinh H<sub>2</sub>S sẽ có sắc tố đen.

#### 3.2. Điều kiện ủ ấm

- Khí trường: *Shigella* thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí tuy tiện, có thể ủ ở điều kiện khí trường thường hoặc khí trường 5%CO<sub>2</sub>.
- Nhiệt độ: có thể phát triển ở nhiệt độ 8-40°C và nhiệt độ tối ưu là 37°C.
- Thời gian ủ ấm: 18-24 giờ.

#### 3.3. Hình thái khuẩn lạc

- Trên môi trường lỏng, vi khuẩn mọc nhanh và làm đục đều môi trường.
- Trên môi trường đặc, khuẩn lạc tròn, lồi, bờ đều, trong, đường kính 2mm sau 24 giờ.

- Trên môi trường có lactose như DCA, SS, Mac Conkey khuẩn lạc trong suốt, hơi hồng (màu môi trường) do không lên men Lactose.
- Trên môi trường có chất ức chế chọn lọc, *Shigella* phát triển kém.

#### 4. Tính chất hóa sinh chính

*Shigella* thuộc họ vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae* nên có các tính chất chung của họ này là oxydase (-), glucose (+).

Ngoài ra còn có một số tính chất đặc trưng cho loài như:

- Không lên men đường lactose (trừ *S. sonnei* lên men chậm sau 48 giờ), saccarose.

- Lên men đường mannitol (trừ *S. dysenteria*).

- Phản ứng (+): RM, indol (đôi khi (-)).

- Phản ứng (-): VP, citrate simmons, H<sub>2</sub>S, di động, sinh hơi (trừ *S. flexneri* typ 4, 6, *S. boydii* typ 1, 8, 14), LDC, ODC (trừ *S. sonnei*), ADH.

Nhận định tính chất hóa sinh trên môi trường song đường Kligler:

- Phần tù màu vàng do lên men glucose.

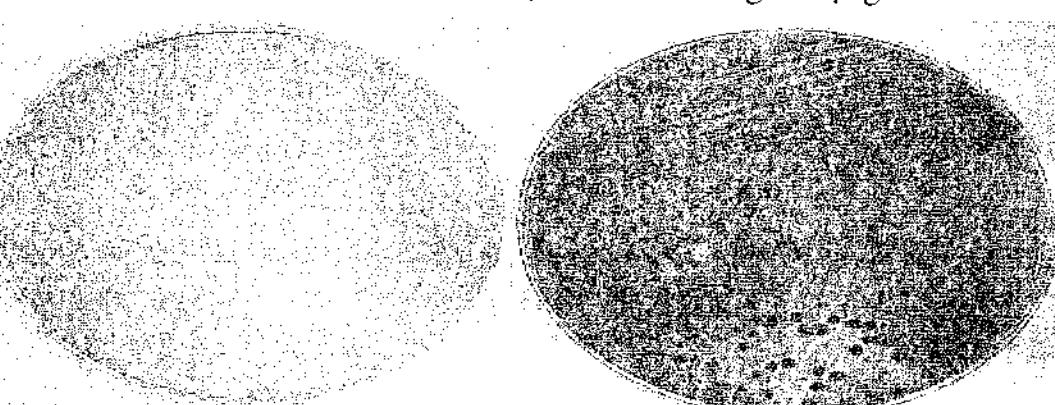
- Phần nghiêng có màu đỏ do không lên men lactose.

Nhận định tính chất hóa sinh trên môi trường Manit:

- Màu vàng do lên men mannitol: *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*.

- Màu đỏ do không lên men mannitol: *S. dysenteria*.

Nhận định tính chất hóa sinh trên thạch mềm: không di động.



**Hình 26. Khuẩn lạc *Shigella* (bên trái) không màu do không lên men lactose và *E. coli* (bên phải) màu đỏ do lên men lactose trên môi trường SS**

## 5. Chẩn đoán khẳng định

Dựa vào tính chất sinh vật học ngưng kết với các kháng huyết thanh đơn giá.

Dựa vào kháng nguyên thân O và các tính chất sinh vật hoá học, *Shigella* được chia làm 4 nhóm:

- Nhóm A: *S. dysenteriae* (có 10 typ huyết thanh; *S. Shiga* 1 typ huyết thanh)
- Nhóm B: *S. flexneri* (có 6 typ huyết thanh chính và 6 typ huyết thanh phụ)
- Nhóm C: *S. boydii* (có 15 typ huyết thanh).
- Nhóm D: *S. sonnei* (chỉ có 1 typ huyết thanh)

## 6. Chẩn đoán phân biệt

Phân biệt với *E. coli*:

- Indol (+)
- Lactose (+)
- Di động (+)
- Không ngưng kết với kháng huyết thanh *Shigella*.

## Bài 25

# NUÔI CẤY, PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH STAPHYLOCOCCI

### Mục tiêu

1. Trình bày được các tiêu chuẩn chẩn đoán *Staphylococci*.
2. Thực hiện được các bước định danh *Staphylococcus aureus*.
3. Chẩn đoán phân biệt *S. aureus* và *Staphylococci coagulase (-)*.

### 1. Giới thiệu

*Staphylococci* là những cầu khuẩn, bắt màu Gram (+), kích thước từ 0,8-1,0 µm và thường xếp thành đám hình chùm nho. Chúng không có lông nên không di động, không có nha bào. Hô hấp hiếu khí và kỵ khí tùy tiện.

Tính chất hoá sinh chung của *Staphylococci*:

- Catalase (+).
- Oxidase (-).
- Di động (-).
- Canh thang muối 6.5% (+).

*Staphylococci* thường cư trú ở da, đường hô hấp trên của người và động vật. Tỷ lệ mang *Staphylococci* cao đặc biệt ở bệnh nhân nằm viện và nhân viên y tế.

*Staphylococci aureus* (tụ cầu vàng) là vi khuẩn gây bệnh thường gặp nhất và có khả năng gây nhiều loại bệnh khác nhau, kể cả nhiễm trùng bệnh viện.

*Staphylococci coagulase (-)* trước đây được coi là vi khuẩn tạp nhiễm, không gây bệnh. Ngày nay đã có nhiều nghiên cứu cho thấy *Staphylococci coagulase (-)* cũng có vai trò gây bệnh giống như *S. aureus*. Các nhiễm trùng có thể gặp là nhiễm trùng tiết niệu, nhiễm trùng máu, viêm nội nhãn sau phẫu thuật, viêm nội tâm mạc, viêm tuỷ xương... Đặc biệt *Staphylococci coagulase (-)* cũng có thể là căn nguyên gây nhiễm trùng bệnh viện. Sự đề kháng của các *Staphylococci coagulase (-)* với kháng sinh cũng giống như *S. aureus*.

## 2. Hình thể và tính chất bắt màu

*Staphylococci* là những cầu khuẩn bắt màu Gram dương, kích thước từ 0,8-1,0 µm và thường xếp thành đám hình chùm nho, có khi xếp riêng lẻ, xếp đôi hoặc xếp bốn. *Staphylococci* không di động, không sinh nha bào và thường không có vỏ, chỉ có một số ít chủng có vỏ.

## 3. Nuôi cây, phân lập

### 3.1. Môi trường

Môi trường thích hợp để nuôi cây, phân lập *Staphylococci* là thạch máu. Ngoài ra, có thể sử dụng các loại môi trường khác như Mannitol Salt Agar (Chapmann), Uriselect 4 (nếu bệnh phẩm là nước tiểu), CHROMagar Staph...

### 3.2. Điều kiện ủ ám

Khí trường: *Staphylococci* là vi khuẩn hiếu khí tuy tiện, có thể ủ ở điều kiện khí trường thường hoặc khí trường 5%CO<sub>2</sub>.

Nhiệt độ: Có thể phát triển ở nhiệt độ 15-40°C và nhiệt độ tối ưu là 35-37°C nhưng sinh sắc tố ở nhiệt độ 20-25°C.

Thời gian ủ ám: 12-24 giờ.

### 3.3. Hình thái khuẩn lạc

Mọc tốt trên các môi trường nuôi cây thông thường, kể cả thạch thường. Trên môi trường thạch máu, *Staphylococci* thường có khuẩn lạc dạng S, đường kính 1-2 mm, sắc tố màu trắng, hoặc vàng và có thể có tan máu β (tan máu hoàn toàn) hoặc γ (không tan máu).

## 4. Tính chất hoá sinh chính của *Staphylococcus aureus*

- Catalase (+)
- Coagulase trên lam (+) và trên ống (+)
- Mannitol (+).
- Phân giải DNase (+).

## 5. Chẩn đoán phân biệt

Một số *Staphylococci* có thể có coagulase (+), tuy nhiên chúng ít khi gây bệnh:

- *S. schleiferi* và *S. lugdunesis* có coagulase trên lam (+)
- *S. intermedius* và *S. hyicus* có coagulase trên lam (+) và trên ống (+)

Bảng 1. Tiêu chuẩn phân biệt Staphylococci

Tính chất	Sinh sắc tố	Coagulase	Lên men mannit	Novobiocin	Polymyxin B
<i>S. aureus</i>	+	+	+	S	S
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	S	R
<i>S. saprophyticus</i>	+/-	-	+/-	R	S
<i>S. haemolyticus</i>	+/-	-	+/-	S	S
<i>S. lugdunensis</i>	+/-	-	-	S	S/R
<i>S. schleiferi</i>	-	-	-	S	S
<i>S. simulans</i>	-	-	+	S	S

## Bài 26

# NUÔI CẤY, PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH STREPTOCOCCI

### Mục tiêu

1. Trình bày được các tiêu chuẩn chẩn đoán Streptococci.
2. Thực hiện được các bước định danh Enterococci, *Streptococcus pneumoniae*.
3. Chẩn đoán phân biệt được các Streptococci.

### 1. Giới thiệu

*Streptococci* (liên cầu khuẩn) là tác nhân gây bệnh phổ biến. *Streptococci* thường gây viêm đường hô hấp trên, viêm nội tâm mạc, viêm da, viêm tai giữa, viêm xoang, thậm chí gây viêm màng não, nhiễm trùng sản khoa, viêm đường sinh dục phụ nữ, kể cả nhiễm trùng bệnh viện.

Năm 1919, Brown xếp loại *Streptococci* dựa vào hình thái tan máu khác nhau khi chúng phát triển trên môi trường thạch máu:

- Liên cầu tan máu α (tan máu không hoàn toàn).
- Liên cầu tan máu β (tan máu hoàn toàn).
- Liên cầu tan máu γ (không tan máu).

Năm 1930, Lancefield dựa vào kháng nguyên C (carbonhydrat) của vách tế bào vi khuẩn để xếp *Streptococci* thành các nhóm từ A đến R.

- *Streptococci* tan máu β:
  - + Nhóm A: *S. pyogenes*
  - + Nhóm B: *S. agalactiae*
  - + Nhóm C: *S. anginosus*, *S. equysmilis*
  - + Nhóm D: *S. bovis*
  - + Nhóm F: *S. anginosus*
  - + Nhóm G: *S. anginosus*
- *Streptococci* tan máu α:
  - + *S. viridans*: *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mitis*...
  - + *S. pneumoniae* (phé cầu)

*Streptococci* là những vi khuẩn hiếu khí tùy tiện, có catalase (-) (đặc

điểm để phân biệt với tụ cầu). *Streptococci* phát triển thuận lợi trong môi trường có oxy hoặc 5-7%CO<sub>2</sub>, đặc biệt là phế cầu (*S. pneumoniae*).

## 2. Hình thể và tính chất bắt màu

*Streptococci* là những cầu khuẩn, có thể hình bầu dục (*Enterococci*) hoặc có hình mũi giáo, hình ngọn nến (*S. pneumoniae*), bắt màu Gram dương, kích thước trung bình 0,6-1μm, xếp thành chuỗi dài ngắn khác nhau, ngoại trừ *S. pneumoniae* xếp thành đôi. *Streptococci* không di động, không nha bào. Đôi khi có vỏ.

## 3. Nuôi cấy, phân lập

### 3.1. Môi trường

Môi trường thông thường để nuôi cấy phân lập *Streptococci* là thạch máu.

### 3.2. Điều kiện ủ ám

Khí trường: *Streptococci* thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí tuỳ tiện, có thể ủ ở điều kiện khí trường thường hoặc khí trường 5%CO<sub>2</sub>.

Nhiệt độ: Có thể phát triển ở nhiệt độ 15-40°C và nhiệt độ tối ưu là 35-37°C nhưng sinh sắc tố ở nhiệt độ 20-25°C.

Thời gian ủ ám: 12-24 giờ.

### 3.3. Hình thái khuẩn lạc

Trên môi trường thạch máu, *Streptococci* thường có khuẩn lạc dạng S, đường kính 1-2 mm, sắc tố màu trắng, hoặc vàng và có thể có tan máu α, β hoặc γ.

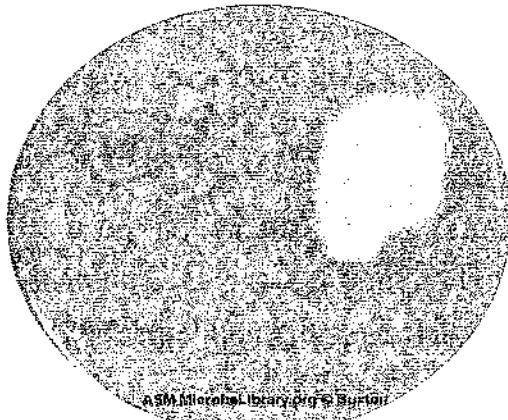
## 4. Tính chất hoá sinh chính

### - *S. pneumoniae*:

- + Nhạy cảm với Optochin
- + Tan trong muối mật.
- + *S. pyogenes* (Group A): nhạy cảm với Bacitracin (+)
- + *S. agalactiae* (Group B): CAMP (+)

### - *Enterococci*:

- + Bile esculin (+)
- + NaCl 6.5% (+)



*Hình 27. Hình ảnh Streptococci tan máu α (tan máu không hoàn toàn), β (tan máu hoàn toàn), γ (không tan máu)*

*Bảng 1. Tiêu chuẩn chẩn đoán Streptococci và Enterococci  
(Theo phân loại của Lancefield).*

Nhóm	Tan máu	Bacitracin	CAMP test	Bile esculin	Canh thang NaCl 6,5%	Optochin	Ngưng kết nhóm
Nhóm A: <i>S. pyogenes</i>	β	(+)					A
Nhóm B: <i>S. agalactiae</i>	β, γ		(+)				B
Nhóm C: <i>S. equisimilis</i>	β						C
<i>Enterococci</i>	α, β, γ		-	(+)	(+)		D
Nhóm D	α, β, γ			(+)	(-)		D
Nhóm G: <i>S. milleri</i>	β						G
Nhóm F: <i>S. angrinosus</i>	β						F
<i>S. suis</i> (Liên cầu lợn)	α						
<i>S. pneumoniae</i>	α -					(+)	
<i>S. viridans</i>	α						

Bài 27

## KHÁNG SINH ĐỒ PHƯƠNG PHÁP KHOANH GIẤY KHÁNG SINH KHUẾCH TÁN (DISK DIFFUSION METHOD)

### Mục tiêu

1. Thực hiện được các bước của kỹ thuật khoanh giấy kháng sinh khuếch tán Kirby Bauer.
2. Bảo quản được khoanh giấy kháng sinh theo đúng quy định.
3. Lựa chọn đúng các kháng sinh cần thử cho một số vi khuẩn gây bệnh.
4. Tiến hành nội kiểm được kỹ thuật kháng sinh đồ.
5. Nhận định được kết quả kháng sinh đồ.

### 1. Môi trường

#### 1.1. Thạch Mueller - Hinton

Môi trường phải là chuẩn hoá cao, giúp các vi khuẩn gây bệnh thông thường có thể mọc tốt.

Có rất nhiều loại môi trường nhưng thạch Mueller - Hinton là thạch tốt nhất để làm thử nghiệm kháng sinh đồ vì:

- Có đầy đủ các yếu tố giúp cho hầu hết các vi khuẩn gây bệnh có thể phát triển được.
- Úc chế thấp với sulfonamide, trimethoprim, tetracyclin.
- Chất lượng môi trường ổn định từ mè này đến mè khác.
- Đã được tiến hành nghiên cứu với số lượng lớn. Nếu môi trường không thích hợp, nghèo dinh dưỡng, vi khuẩn kém phát triển thì vòng vô khuẩn sẽ lớn dẫn đến kết quả sai.

#### 1.2. Các yếu tố cần thiết để vi khuẩn phát triển

Một số vi khuẩn cần thêm 5% máu cừu hoặc thỏ thì mới phát triển được như các loại liên cầu, phế cầu...).

- Tuy nhiên ở môi trường có máu thì vòng vô khuẩn sẽ nhỏ lại như khoanh giấy của oxacillin, methicillin (nhỏ 2 - 3 mm), vòng vô khuẩn to ra ở xung quanh khoanh giấy sulfonamide và trimethoprim.

Một số vi khuẩn cần thêm các yếu tố bổ trợ để phát triển như vitamin, yếu tố X, V để phát triển (*H. influenzae*).

### 1.3. Thymidine hoặc Thymine

Môi trường có chứa số lượng quá lớn thymidine hoặc thymine có thể dẫn đến việc ức chế sulfonamide, trimethoprim làm cho vòng vô khuẩn nhỏ hơn, thậm chí không có vòng vô khuẩn, dẫn đến kết quả sai.

Thêm thymidine phosphorylase hoặc máu cừu bị ly giải có thể làm tăng rõ ràng vòng vô khuẩn của sulfonamide và trimethoprim khi thử với đa số các loại vi khuẩn gây bệnh (trừ *Enterococci*). Vì vậy, nên sử dụng chủng mẫu *Enterococcus faecalis* ATCC 29213 để kiểm tra chất lượng của môi trường có thêm máu cừu hoặc thỏ.

Thạch Mueller-Hinton có chứa sẵn một lượng vừa đủ thyamine tự do.

### 1.4. Các cation

Lượng ion Mg<sup>++</sup> và Ca<sup>++</sup> có ảnh hưởng lớn đến hoạt động của tetracycline và aminoglycoside. Các ion này có hàm lượng khác nhau trong mỗi hãng sản xuất khác nhau và trong các lô môi trường khác nhau.

Vì vậy, cần phải tiến hành thử nghiệm giám sát chất lượng môi trường khi có mẻ môi trường mới bằng chủng mẫu *P. aeruginosa* ATCC 27853.

### 1.5. Độ pH

Độ pH nên khoảng 7,2 - 7,4 tại nhiệt độ phòng, khi đó môi trường mỗi mẻ thạch cần được kiểm tra pH, pH có ổn định thì kết quả kháng sinh đồ mới chính xác.

Độ pH có ảnh hưởng tới tốc độ phát triển của vi khuẩn và tác động lên vi khuẩn gây ảnh hưởng đến kết quả kháng sinh đồ.

Độ pH còn ảnh hưởng tới hoạt động của kháng sinh:

- pH thấp làm hoạt động kháng sinh giảm và vòng vô khuẩn nhỏ như đối với aminoglycoside, clindamycin, erythromycin, quynolon.

- pH thấp làm hoạt động kháng sinh tăng và vòng vô khuẩn rộng như tetracycline, nitrofuratoxin, novobiocin, methicillin, oxaciclin.

Khi hấp lò ở nhiệt độ cao, thời gian kéo dài sẽ làm pH giảm, môi trường sẽ có màu nâu xám.

### **1.6. Độ ẩm của thạch**

Trước khi ria cấy vi khuẩn vào môi trường phải làm khô mặt thạch vì mặt thạch ướt vi khuẩn sẽ mọc dày làm thu hẹp vòng ức chế.

Làm khô mặt thạch bằng cách để tủ ám khoảng 15 - 30 phút, không để lâu hơn vì sẽ làm quá khô mặt thạch, vi khuẩn khó mọc và ảnh hưởng đến sự khuếch tán kháng sinh, làm vòng vô khuẩn nhỏ lại.

### **1.7. Độ dày của thạch**

Độ dày trung bình của thạch là  $4 + 0.5$  mm, không nên quá dày hoặc quá mỏng sẽ làm kháng sinh khuếch tán nhiều hơn theo chiều sâu hoặc chiều ngang làm sai kết quả.

### **1.8. Các môi trường đặc biệt**

- *S. aureus* để thử Oxacillin.
- Thạch Mueller Hinton có máu cho *S. pneumoniae*.
- Thạch Mueller Hinton có yếu tố X và V cho *Haemophylus*.

## **2. Huyền dịch vi khuẩn dùng trong thử nghiệm**

Huyền dịch vi khuẩn dùng trong thử nghiệm là  $10^8$  vi khuẩn/ml. So sánh với độ đục chuẩn Mc Farland 0.5 (pha bằng BaSO<sub>4</sub>) có nồng độ tương đương với nồng độ  $10^8$  vi khuẩn/ml.

Có hai phương pháp chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn:

- Chọn trực tiếp khuẩn lạc: chủng vi khuẩn dùng trong phương pháp này phải thuần, vừa được nuôi cấy qua đêm. Nhặt 3 - 5 khuẩn lạc cùng loại trên môi trường nuôi cấy thuần, qua đêm. Hòa đều trong 3 - 5 ml nước muối sinh lý. Lắc đều bằng tay hoặc máy lắc. So sánh tương đương với độ đục chuẩn Mc Farland 0,5, điều chỉnh độ đục bằng cách thêm nước muối sinh lý hoặc vi khuẩn.

- Nuôi cấy trong canh thang: Nhặt 3 - 5 khuẩn lạc cùng loại trên môi trường nuôi cấy thuần. Hòa đều trong 4 - 5 ml canh thang thích hợp (tryptic soy broth, BHI). Ủ ám canh thang ở 35°C cho đến khi so sánh tương đương với độ đục chuẩn Mc Farland 0.5 (khoảng sau 2 - 6 giờ). Điều chỉnh độ đục bằng cách thêm canh thang hoặc vi khuẩn.

### 3. Ria vi khuẩn

Trong vòng 15 phút sau khi điều chỉnh độ đặc, dùng que tăm bông vô trùng nhúng vào cạnh khuân, xoay tròn tăm bông vài lần rồi vắt bớt nước bằng cách ép tăm bông vào thành ống. Dùng tăm bông vạch ngang 2 lần vuông góc trên mặt đĩa thạch. Sau đó ria tăm bông đều lên mặt thạch bằng cách mỗi lần ria xoay đĩa 60°.

### 4. Khoanh giấy kháng sinh

*Bảo quản kháng sinh:* mỗi khoanh giấy kháng sinh được thẩm một hàm lượng nhất định tính bằng µg/ml. Mỗi kháng sinh có độ bền khác nhau. Nhiệt độ và độ ẩm cao dễ làm bất hoạt kháng sinh nhất là kháng sinh họ β-lactam. Vì vậy, đối với kháng sinh sử dụng hàng ngày phải được bảo quản ở 2-8°C (ngăn dưới tủ lạnh). Các kháng sinh bảo quản lâu hơn phải bảo quản ở - 20°C (ngăn đá).

*Chọn kháng sinh:* mỗi loại kháng sinh có phổ tác dụng nhất định với từng loại vi khuẩn. Vì vậy mỗi loại vi khuẩn sẽ được thử với một số loại kháng sinh nhất định. Các kháng sinh này được chọn theo tài liệu hướng dẫn của CLSI (Bảng hướng dẫn lựa chọn kháng sinh).

*Đặt kháng sinh:* dùng kim đầu nhọn đặt nhẹ khoanh giấy cho tiếp xúc đều trên mặt thạch. Khoảng cách giữa các khoanh giấy là 24 mm, cách rìa đĩa thạch 15 mm. Như vậy đĩa thạch đường kính 10 cm có thể đặt 5 - 6 khoanh giấy kháng sinh.

### 5. Điều kiện ủ ám

Nhiệt độ quá cao làm đường kính vòng vô khuân sẽ nhỏ lại.

Điều kiện ủ ám cho các vi khuẩn thông thường là 35-37°C/ khí trườn thường/ 18-20 giờ.

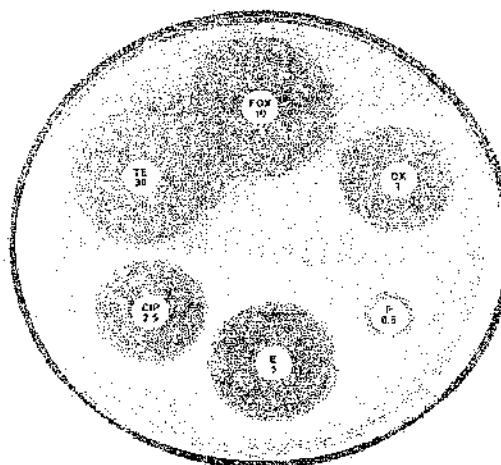
Đặc biệt:

- *Campylobacter* ủ ở 42°C.
- *S. aureus* thử độ nhạy cảm với oxacillin ủ ở 30°C, 24 giờ.
- *Enterococci* thử độ nhạy cảm với vancomycin cần ủ 24 giờ.
- *Yersinia pestis* cần ủ 25°C.
- *Haemophylus* cần ủ trong điều kiện có 5-7% CO<sub>2</sub>.

## 6. Đọc và diễn giải kết quả

Đo đường kính vòng vô khuẩn xung quanh khoanh giấy kháng sinh, đường kính được tính ra milimet. Đường kính này được chia thành các mức độ nhạy cảm, trung gian, đề kháng dựa vào bảng chuẩn theo hướng dẫn của tài liệu CLSI.

Kết quả kháng sinh đồ được chia thành các loại A, B, C, U, O để ưu tiên chọn lọc trong điều trị (Bảng diễn giải đường kính vùng ức chế)



Hình 28. Kỹ thuật khoanh giấy kháng sinh khuếch tán

## 7. Kiểm tra chất lượng

### 7.1. Mục đích

- Giám sát tính chính xác của thử nghiệm kháng sinh đồ.
- Giám sát các vật liệu, môi trường sử dụng trong thử nghiệm.
- Giám sát kỹ thuật tiến hành và đọc kết quả của người xét nghiệm.

### 7.2. Chọn chủng kiểm tra chất lượng

Các chủng kiểm tra chất lượng là chủng mầm ATCC có độ nhạy cảm nhất định với các kháng sinh (độ nhạy này là một hằng số không đổi).

- *E. coli* ATCC 25922 (Kiểm tra hàng ngày hoặc hàng tuần).
- *S. aureus* ATCC 25923 (Kiểm tra hàng ngày hoặc hàng tuần).
- *P. aeruginosa* ATCC 27853 ((Kiểm tra mỗi khi có mẻ môi trường mới))
- *E. faecalis* ATCC 29212 (Kiểm tra kháng sinh đồ có thêm máu).
- *S. pneumoniae* ATCC 49619 (Kiểm tra song song với chủng phế cầu).

- *H. influenzae* ATCC 49247 (Kiểm tra song song với chủng *H. influenzae*).

### 7.3. Đánh giá chất lượng

Để đánh giá tính chính xác của thử nghiệm, tiến hành thử kháng sinh đồ của chủng mới phân lập được song song với chủng mẫu ATCC theo ngày hoặc theo tuần trong cùng một môi trường và điều kiện thử nghiệm.

Khi đọc kết quả nếu đường kính vòng vô khuẩn của chủng mẫu ATCC ở trong giới hạn cho phép có nghĩa là kỹ thuật thực hiện chính xác (Bảng kiểm tra chất lượng). Nếu ngoài giới hạn cho phép ta phải kiểm tra lại xem khâu sai sót có thể do kỹ thuật tiến hành, do môi trường, do người thực hiện để sửa chữa. Đối với thử nghiệm so sánh hàng ngày sai sót cho phép là 1/20, so sánh hàng tuần sai sót cho phép là 1/30.

Bảo quản chủng chuẩn quốc tế ở - 20°C, cây chuyền hàng tháng. Chủng sử dụng hàng tuần giữ ở thạch nghiêng, chuyền ra đĩa trước khi sử dụng.

### 8. Những sai sót thường gặp

- Đọc kết quả đường kính vô khuẩn sai.
- Chủng bị nhiễm bẩn hoặc nhầm lẫn thành chủng khác.
- Nồng độ vi khuẩn pha vào quá đặc hoặc quá loãng.
- Độ đục Mc Faland 0.5 không chuẩn.
- Điều kiện ủ ám về nhiệt độ, thời gian, khí trào không đúng quy định.
- Môi trường không chuẩn, quá hạn sử dụng, hấp môi trường sai.
- Bảo quản kháng sinh không tốt ảnh hưởng đến hoạt lực.

Nên tiến hành thử nghiệm lại hoặc kiểm tra lại.

### 9. Giới hạn của phương pháp khoanh giấy kháng sinh khuếch tán

Phương pháp này là chuẩn hoá cho các vi khuẩn ura khí, dễ mọc như *Staphylococci*, *Streptococci*, *Enterococci*, *Enterobacteriaceae*, *V.cholerae*, *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* spp.

Là phương pháp cải tiến cho các vi khuẩn khó mọc như *Haemophilus*, *Streptococci*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*.

H.

Đối với các vi khuẩn khác như *Campylobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium* spp. không nên thử phương pháp này vì đòi hỏi phải có môi trường, khí trao đổi, thời gian ủ đặc biệt.

tò  
iy

Kết quả có thể nhầm khi thử một số kháng sinh đối với một số vi khuẩn đặc biệt:

ờ

- *Salmonella* và *Shigella* khi thử với cephalosporin thế hệ 1, 2 và aminoglycoside.

m

- *S. aureus* kháng methicillin khi thử với các kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam (trừ oxacillin).

ai

- *Enterococci* khi thử với cephalosporin, aminoglycoside, clindamycin, co-trimoxazol.

ra

- *Listeria* khi thử với cephalosporin.

ih

Khoanh giấy kháng sinh khuếch tán chỉ là phương pháp thử nghiệm *in vitro* nên có những trường hợp kết quả là nhạy cảm nhưng thực tế điều trị lại không có tác dụng do phụ thuộc vào một số yếu tố:

g

- Kháng sinh: đường vào, liều lượng, thời gian và được lực học.
- Vi khuẩn
- Người bệnh

;

## 10. Những vấn đề kháng kháng sinh cần chú ý

;

- (1). *S. aureus* kháng methicillin (MRSA). *S. aureus* giảm nhạy cảm với vancomycin (VRSA).
- (2). *Enterococci* kháng penicillin, ampicillin. *Enterococci* kháng vancomycin (VRE).
- (3). *E. coli*, *Klebsiella* sinh  $\beta$ -lactamase phổ rộng (ESBL) kháng cephalosporin thế hệ 3, 4.
- (4). *Salmonella*, *Shigella* kháng quinolon.
- (5). *S. pneumoniae* kháng penicillin.
- (6). *Neisseria gonorrhoeae* kháng penicillin.
- (7). *H. influenzae* sinh  $\beta$ -lactamase.
- (8). *Moraxella catarrhalis* sinh  $\beta$ -lactamase.

;

**Bảng 1. Lựa chọn kháng sinh thử nghiệm và diễn giải đường kính vùng ức chế của *E. coli* và trực khuẩn đường ruột khác**

TT	Kháng sinh	Nồng độ ( $\mu\text{g}$ )	Ký hiệu	Ký hiệu Whonet	Đường kính S,I,R	Ghi chú
1.	Ampicilin	10	AM	AMP	14-16	
2.	Piperacillin	100	PIP	PIP	18-20	
3.	Ertapenem	10	ETP	ETP	16-18	
4.	Imipenem	10	IMP	IMP	14-15	
5.	Meropenem	10	MEM	MEM	14-15	
6.	Cephalothine	30	CF	CEF	15-17	
7.	Cefuroxime	30	CXM	CXA	15-17	
8.	Ceftazidime	30	CAZ	CAZ	18-20	
9.	Ceftriaxone	30	CRO	CRO	20-22	
10.	Cefotaxime	30	CTX	CTX	23-25	
11.	Cefoxitin	30	FOX	FOX	15-17	
12.	Cefepime	30	FEP	FEP	15-17	
13.	Amo+A.clavula	20/10	AMC	AMC	14-17	
14.	Ampi + Sulbact	20	SAM	SAM	12-14	
15.	Piper+Tazobact	10	TZP	TZP	18-20	
16.	Gentamicine	10	GM	GEN	13-14	
17.	Tobramicine	10	TM	TOB	13-14	
18.	Amikacin	30	AN	AMK	15-16	
19.	Ciprofloxacin	5	CIP	CIP	15-21	
20.	Levofloxacin	5	LVX	LVX	13-17	
21.	Co-trimoxazol	25	SXT	SXT	11-15	
22.	Fosmycin	50	FOS	FOS	13-15	

Trong quá trình điều trị một số vi khuẩn mới xuất hiện đề kháng. Vì vậy lúc đầu thử nghiệm kháng sinh đồ vi khuẩn có thể nhạy cảm sẽ trở thành đề kháng sau 3-4 ngày điều trị.

- Thường gặp ở các vi khuẩn như *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* khi thử với cephalosporin thế hệ 3.

- *P. aeruginosa* khi thử với tất cả các kháng sinh.

- *S. aureus* khi thử với các kháng sinh nhóm quinolon.

Trong những trường hợp này nên tiến hành lại thử nghiệm kháng sinh để.

**Bảng 2. Lựa chọn kháng sinh thử nghiệm và diễn giải đường kính vùng ức chế của *P. aeruginosa* và *Pseudomonas spp.* khác**

TT	Kháng sinh	Nồng độ (μg)	Ký hiệu	Ký hiệu Whonet	Đường kính S,I,R	Ghi chú
1.	Piperacillin	100	PIP	PIP	≥18	
2.	Ticarcillin	75	TIC	TIC	≥15	
3.	Aztreonam	30	ATM	ATM	16-21	
4.	Imipenem	10	IMP	IMP	14-15	
5.	Meropenem	10	MEM	MEM	14-15	
6.	Ceftazidime	30	CAZ	CAZ	15-17	
7.	Cefepime	30	FEP	FEP	15-17	
8.	Tica+A.clavulanic	75/10	TCC	TCC	≥15	
9.	Piper+Tazobactam	10	TZP	TZP	≥18	
10.	Gentamycine	10	GM	GEN	13-14	
11.	Tobramycine	10	TM	TOB	13-14	
12.	Amikacin	30	AN	AMK	15-16	
13.	Ciprofloxacin	5	CIP	CIP	16-20	
14.	Levofloxacin	5	LVX	LVX	14-16	
15.	Colistin	10	CS	COL	≥11	
16.	Polymixin	300 IU	PB	POL	≥12	

**Bảng 3. Lựa chọn kháng sinh thử nghiệm và diễn giải đường kính vùng ức chế của *Acinetobacter baumannii***

TT	Kháng sinh	Nồng độ (μg)	Ký hiệu	Ký hiệu Whonet	Đường kính S,I,R	Ghi chú
1.	Piperacillin	100	PIP	PIP	18-20	
2.	Imipenem	10	IMP	IMP	14-15	
3.	Meropenem	10	MEM	MEM	14-15	
4.	Ceftazidime	30	CAZ	CAZ	15-17	
5.	Ceftriaxone	30	CRO	CRO	14-20	
6.	Cefotaxime	30	CTX	CTX	15-22	

TT	Kháng sinh	Nồng độ ( $\mu\text{g}$ )	Ký hiệu	Ký hiệu Whonet	Đường kính S,I,R	Ghi chú
7.	Cefepime	30	FEP	FEP	15-17	
8.	Ampi + Sulbact	20	SAM	SAM	12-14	
9.	Tica+A.clavulanic	75/10	TCC	TCC	15-19	
10.	Piper+Tazobactam	10	TZP	TZP	18-20	
11.	Gentamycine	10	GM	GEN	13-14	
12.	Tobramycine	10	TM	TOB	13-14	
13.	Amikacin	30	AN	AMK	15-16	
14.	Ciprofloxacin	5	CIP	CIP	16-20	
15.	Levofloxacin	5	LVX	LVX	14-16	
16.	Doxycyclin	30	DO	DOX	10-12	
17.	Minocyclin	30	MNO	MNO	13-15	
18.	Co-trimoxazol	25	SXT	SXT	11-15	

Bảng 4. Lựa chọn kháng sinh thử nghiệm và diễn giải đường kính vùng ức chế của *Staphylococcus aureus*

TT	Kháng sinh	Nồng độ ( $\mu\text{g}$ )	Ký hiệu	Ký hiệu Whonet	Đường kính S,I,R	Ghi chú
1.	Penicillin	10	P	PEN	$\geq 29$	
2.	Cefoxitin	30	FOX	FOX	$\geq 22$	
3.	Erythromycine	15	E	ERY	14-22	
4.	Azithromycin	15	AZM	AZM	14-17	
5.	Clindamycin	2	CM	CLI	15-20	
6.	Vancomycin	30	VA	VAN	MIC	
7.	Gentamycine	10	GM	GEN	13-14	
8.	Ciprofloxacin	5	CIP	CIP	16-20	
9.	Levofloxacin	5	LVX	LVX	14-16	
10.	Chloramphenicol	30	CL	CHL	13-17	
11.	Tetracycline	30	TE	TCY	15-18	
12.	Co-trimoxazol	25	SXT	SXT	11-15	
13.	Lizonalid	30	LZD	LNZ	$\geq 21$	

**Bảng 5. Lựa chọn kháng sinh thử nghiệm và diễn giải  
đường kính vùng ức chế của Enterococci**

TT	Kháng sinh	Nồng độ ( $\mu\text{g}$ )	Ký hiệu	Ký hiệu Whonet	Đường kính S,I,R	Ghi chú
1.	Penicillin	10	P	PEN	$\geq 29$	
2.	Erythromycine	15	E	ERY	14-22	
3.	Vancomycin	30	VA	VAN	15-16	
4.	Ciprofloxacin	5	CIP	CIP	16-20	
5.	Levofloxacin	5	LVX	LVX	14-16	Nước tiểu
6.	Chloramphenicol	30	CL	CHL	13-17	
7.	Doxycyclin	30	DO	DOX	13-15	
8.	Minocyclin	30	MNO	MNO	15-18	
9.	Lizonalid	30	LZD	LNZ	21-22	
10.	Nitrofuratoin	300	FT	NIT	15-16	Nước tiểu
11.	Fosmycin	50	FOS	FOS	13-15	

**Bảng 6. Bảng kiểm tra chất lượng với chủng mủ E. coli ATCC 25922**

TT	Tên kháng sinh	Nồng độ ( $\mu\text{g}$ )	Ký hiệu	Đường kính S, I, R
1.	Ampicilline	10	AM	16 - 22
2.	Ciprofloxacine	5	CIP	30 - 40
3.	Amoxicillin+a.clavulanic	20/10	AMC	19 - 25
4.	Gentamycine	10	GM	19 - 26
5.	Co-trimoxazol	1.25/ 23.75	SXT	24 - 32
6.	Chloramphenicol	30	CL	21 - 27
7.	Ceftriaxone	30	CRO	29 - 35

Bảng 7. Bảng kiểm tra chất lượng với chủng mủ *P. aeruginosa* ATCC 27853

TT	Tên kháng sinh	Nồng độ ( $\mu$ g)	Ký hiệu	Đường kính S, I, R
1	Ceftriaxone	30	CRO	17 - 23
2	Gentamycine	10	GM	16 - 21
3	Ciprofloxacine	5	CIP	25 - 33

Bảng 8. Bảng kiểm tra chất lượng với chủng mủ *S. aureus* ATCC 25923

TT	Tên kháng sinh	Nồng độ ( $\mu$ g)	Ký hiệu	Đường kính S, I, R
1	Penicilline	10 units	P	26 - 37
2	Ampicilline	10	AM	27 - 35
3	Amoxycillin+A.clavulanic	20/10	AMC	28 - 36
4	Oxacilline	1	OX1	18 - 24
5	Ceftriaxone	30	CRO	22 - 28
6	Erythomycine	15	E	22 - 30
7	Vancomycine	30	VA	17 - 21
8	Gentamycine	10	GM	19 - 27
9	Ciprofloxacine	5	CIP	22 - 30
10	Chloramphenicol	30	C	19 - 26
11	Co-trimoxazol	1.25/ 23.75	SXT	24 - 32



## CHƯƠNG IV

### CÁC KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM VIRUS – MIỄN DỊCH

#### Bài 28

#### CHẨN ĐOÁN VIRUS VIÊM GAN B BẰNG CÁC KỸ THUẬT HUYẾT THANH HỌC

##### Mục tiêu

1. Trình bày được mục đích và nguyên lý của kỹ thuật phát hiện các kháng nguyên và kháng thể của HBV trong chẩn đoán nhiễm HBV.
2. Thực hiện được các bước của kỹ thuật theo đúng quy trình.
- 3 Nhận định được kết quả của kỹ thuật phát hiện: HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc IgM, anti-HBc total.

##### 1. Đại cương

Viêm gan virus B do virus viêm gan B (Hepatitis B virus – HBV) gây ra, là một vấn đề mang tính chất toàn cầu. Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), trên thế giới có khoảng 2 tỷ người bị nhiễm HBV, trong đó có 350 triệu - 400 triệu người là những người mang virus viêm gan B mạn tính. Hàng năm ước tính trên thế giới có khoảng 2 triệu người mang HBV mạn tính chết vì xơ gan và ung thư gan nguyên phát.

Việt Nam thuộc vùng dịch tễ có tỷ lệ nhiễm HBV cao (10 - 25%).

##### 2. Hệ thống kháng nguyên – kháng thể của HBV

###### 2.1. HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*)

Là dấu ấn đầu tiên của virus viêm gan B xuất hiện trong huyết thanh bệnh nhân, khoảng 2-6 tuần trước khi có triệu chứng lâm sàng và từ 2-12 tuần sau khi tiếp xúc. Sự hiện diện của HBsAg là bằng chứng có ý nghĩa nhất của sự nhiễm HBV. Trong viêm gan B cấp, HBsAg có thể dương tính kéo dài từ 1-3 tháng và trở về âm tính, nhưng cũng có thể tồn tại đến 6 tháng hoặc suốt

đời. Những người có HBsAg tồn tại trên 6 tháng sau giai đoạn khởi phát được coi là người mang virus viêm gan B mạn tính.

Là kháng thể đặc hiệu kháng HBsAg, xuất hiện sau sự hiện diện của kháng nguyên này hoặc do tiêm vắc xin. Đây là dấu ấn phản ánh tình trạng viêm gan B đã khỏi và/hoặc đã được miễn nhiễm với HBV. Thời điểm xuất hiện của anti-HBs rất thay đổi, từ 1-10 tuần sau khi HBsAg biến mất hoặc khoảng 3 tháng sau khi bệnh khởi phát. Anti-HBs tồn tại gần như suốt đời và có vai trò bảo vệ cơ thể chống lại sự tái nhiễm của HBV.

### **2.3. HBeAg**

Xuất hiện ngay sau sự hiện diện của HBsAg. Trong nhiễm virus viêm gan B cấp tính, HBeAg tồn tại từ vài ngày đến vài tuần rồi biến mất, HBeAg tồn tại lâu hơn trong viêm gan mạn tính, đặc biệt là viêm gan mãn hoạt động. HBeAg không có ý nghĩa về mặt chẩn đoán khi HBsAg đã dương tính nhưng có giá trị về mặt tiên lượng.

### **2.4. Anti-HBe**

AntiHBe là kháng thể thường tìm thấy ở cuối giai đoạn cấp tính. Sự có mặt của anti-HBe phản ánh tình trạng nhân lên của virus đã giảm hoặc chấm dứt.

### **2.5. HBcAg**

Kháng nguyên lõi của virus viêm gan B. HBcAg không tồn tại ở dạng tự do nên không thể dùng phản ứng huyết thanh đặc hiệu để phát hiện được HBcAg trong huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân.

### **2.6. Anti-HBc**

Là kháng thể xuất hiện sớm ngay sau thời kỳ ủ bệnh. Anti-HBc IgM xuất hiện sớm trong những tuần đầu tiên, còn anti-HBc IgG xuất hiện muộn nhưng tồn tại lâu hơn và có thể suốt đời. Anti-HBc không có vai trò bảo vệ cơ thể chống lại sự tái nhiễm của virus, nhưng sự có mặt của nó là chỉ điểm cho thấy viêm gan đang ở giai đoạn cấp, mãn, người mang virus mạn tính hoặc trong tiền sử đã từng nhiễm virus viêm gan B.

### 3. Ý nghĩa của các dấu ấn huyết thanh học trong chẩn đoán viêm gan virus B

	HBsAg	HBeAg	IgM-HBcAb	HBcAb-IgG	HBsAb	HBeAb	HBV-ADN	
Cấp tính	+	+	-	-	-	-	+	Giai đoạn sớm
	-	-	+	-	-	-	±	Cửa sổ
	-	-	-	+	±	+	±	Phục hồi
Mạn tính	+	+	-	+	-	-	+	VR tái HD
	+	-	-	+	-	+	±	VR KHD
	+	±	+	+	-	-	+	VGM bùng phát
	+	-	-	+	-	+	+	ĐB tiền nhân/nhân

### 4. Chẩn đoán huyết thanh học

Triệu chứng lâm sàng của viêm gan B rất khó phân biệt với các loại viêm gan virus khác, chẩn đoán nguyên nhân bắt buộc phải dựa vào các chỉ điểm huyết thanh học: HBsAg, HBeAg, anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs... Các kỹ thuật miễn dịch học như ELISA, sắc ký miễn dịch, hoá phát quang, điện hoá phát quang.... là các kỹ thuật nhạy nhất và kinh tế nhất hiện nay đang được các phòng xét nghiệm sử dụng để phát hiện kháng nguyên và kháng thể của HBV.

**4.1 Bệnh phẩm:** Có thể sử dụng huyết thanh hoặc huyết tương.

#### 4.1.1. Quy trình lấy mẫu xét nghiệm

- Thu thập thông tin bệnh nhân:
  - + Điền đầy đủ các thông tin về bệnh nhân và ngày lấy mẫu trên phiếu xét nghiệm.
  - + Trên ống đựng mẫu cần ghi đầy đủ thông tin về họ tên hoặc mã số, năm sinh hoặc tuổi và ngày lấy mẫu.
- Quy trình lấy máu:

- + Chuẩn bị dụng cụ lấy máu: Bơm kim tiêm vô trùng, Ống nghiệm nhựa có nắp đậy găng tay, khẩu trang, dây ga rô, bông, cồn 70°, bút dạ (loại mực chịu nước).
- + Lấy máu:
  - Lấy máu tĩnh mạch 3- 4 ml máu;
  - Máu lấy xong, bơm nhẹ nhàng máu vào thành ống nghiệm, sau đó đậy nắp ống nghiệm.
- + Tách huyết thanh/huyết tương:
  - Sau khi lấy máu phải để 30-60 phút tiến hành tách huyết thanh/huyết tương. Trường hợp không tách được huyết tương/huyết thanh trong vòng 2 giờ để mẫu ổn định ở nhiệt độ phòng 30 phút, sau đó để ở nhiệt độ 4-8°C và cần phải tách huyết tương/huyết thanh trong vòng 24 giờ.
  - Sử dụng máy ly tâm phải thăng bằng các ống nghiệm trước khi ly tâm. Tiến hành ly tâm tốc độ 2000 - 2500 vòng/phút trong vòng 10 phút. Tách phần huyết thanh,huyết tương vào một ống nghiệm nhựa rồi đóng chặt nắp.
  - Không có máy ly tâm: để ống nghiệm trên giá trong vòng 30ph sau đó để vào tủ lạnh ở nhiệt độ 4-8°C, tối thiểu 2 giờ nhưng không quá 24 giờ sau đó tách huyết thanh/huyết tương cho vào một ống nghiệm nhựa rồi đóng chặt nắp.

*Lưu ý: không sử dụng mẫu máu bị tan huyết*

#### 4.2. Kỹ thuật sắc ký miễn dịch phát hiện HBsAg

##### 4.2.1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh, huyết tương và trong máu toàn phần.

##### 4.2.2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

##### 4.2.3. Quy trình thực hiện

###### **Dụng cụ, thiết bị và hóa chất**

- Dụng cụ thiết bị:

- + Pipet vi lượng 50-100 µl.
- + Típ: 50-100 µl.
- + Giá đựng ống máu.
- + Máy ly tâm.
- Sinh phẩm: Bộ sinh phẩm Determine.(VD).



*Hình 29. Bộ sinh phẩm Determine.*

Lưu ý: Luôn để các thanh thử trong túi chuyên dụng ở nhiệt độ từ 2-30°C.

#### Tiến hành phản ứng

Bệnh phẩm là huyết thanh, huyết tương để làm phản ứng

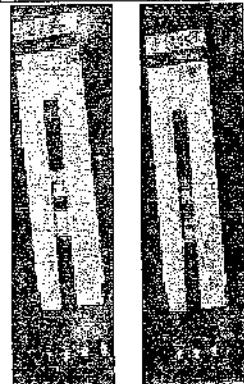
Thứ tự các bước	Nội dung thực hiện
1	Tách rời từng thanh xét nghiệm rồi bóc vỏ
2	Nhỏ 50 µl huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm
3	Chờ 15 phút đọc kết quả

Bệnh phẩm là máu toàn phần làm phản ứng:

Thứ tự các bước	Nội dung thực hiện
1	Tách rời từng thanh xét nghiệm từ phái qua trái
2	Nhỏ 50 µl máu vào vùng nhỏ bệnh phẩm
3	Chờ tới khi máu được hút vào dải lọc, nhỏ 1 giọt dung dịch đệm
4	Chờ 15 phút đọc kết quả

#### 4.2.4. Nhận định kết quả

- Dương tính: Xuất hiện 2 vạch đỏ ở phần chứng và phần bệnh phẩm.
- Âm tính: Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần chứng.
- Không xác định:
  - + Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần bệnh phẩm.
  - + Không có vạch đỏ nào xuất hiện ở phần chứng và phần bệnh phẩm.



#### *4.2.5. Ưu - nhược điểm và ứng dụng*

##### **Ưu điểm**

- Đơn giản, dễ thực hiện.
- Thời gian trả kết quả nhanh.
- Không cần trang thiết bị máy móc.
- Có thể thực hiện được ở các tuyến cơ sở.

##### **Nhược điểm**

- Không lưu trữ được kết quả.
- Không thuận lợi khi làm với số lượng mẫu lớn.
- Độ đặc hiệu không cao bằng ELISA.

### **4.3. Kỹ thuật ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Kỹ thuật miễn dịch gắn men) xác định HBsAg trong phòng xét nghiệm**

#### *4.3.1. Mục đích*

Phát hiện định tính kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) có trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

#### *4.3.2. Nguyên lý*

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA

#### *4.3.3. Quy trình xét nghiệm*

##### **4.3.3.1. Bệnh phẩm**

Huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân

##### **4.3.3.2. Vật liệu/ Trang thiết bị sử dụng**

##### **Trang thiết bị**

- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm..
- Tủ âm 20°C.
- Tủ lạnh 4-8°C

Dụng cụ và vật tư tiêu hao:

- + Pipet vi lượng 100, 1000 µl.
- + Đầu típ: phù hợp với pipet.
- + Giá đựng ống máu
- + Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).

- Găng tay.
  - Tube vô trùng.
  - Ống đồng có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
  - Nước cất 2 lần
  - Giấy dán trong.
  - Giấy thấm.
  - Túi rác các loại.
  - Dung dịch khử trùng.
- Hoá chất, sinh phẩm: bộ sinh phẩm MONOLISA HBsAg UlTra Bio-Rad (VD)
- Microplate(R1): một tấm phiến phản ứng gồm 12 thanh, 8 giếng/thanh.
  - Concentrated washing solution (20X)(R2): dung dịch rửa.
  - Negative control (R3): chứng âm.
  - Positive control (R4): chứng dương.
  - Conjugate (R7): kháng thể cộng hợp enzyme peroxidase.
  - Substrate buffer (R8): dung dịch pha loãng kháng thể cộng hợp.
  - Substrate buffer (R8): dung dịch đậm pha loãng cơ chất.
  - Chromogen Pink coloured (R9): dung dịch chứa tetramethyl benzidine là cơ chất hiện màu phản ứng với enzyme peroxidase.
  - Stop solution (R10): dung dịch dừng phản ứng hiện màu giữa enzyme và cơ chất.

#### 4.3.3.3. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị sinh phẩm: Sinh phẩm cần phải lấy ra khỏi tủ bảo quản sinh phẩm và để ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi tiến hành xét nghiệm.

Lưu ý: Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng. Tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất

- Pha dung dịch cộng hợp (R6+R7): đổ hết dung dịch R6 vào lọ R7. Lắc và đảo trộn nhẹ nhàng dung dịch trong 10 phút.

Lưu ý: ghi ngày hết hạn (1 tháng kể từ ngày pha) lên lọ

- Chuẩn bị các thanh xét nghiệm
  - + Lấy đủ số thanh (R1) cần sử dụng, gắn vào giá đỡ đúng loại và đặt lên giấy thấm.

+ Bảo quản các thanh chưa sử dụng trong túi đựng. Khoá mép tái bằng dụng cụ chuyên dụng. Ghi hạn sử dụng các thanh (1 tháng kể từ ngày mở) lên túi đựng.

+ Các hoá chất khác chưa pha, vẫn được để nguyên ở bao hay lọ gốc được để ở nhiệt độ 2 – 8°C và được dùng cho tới khi hết hạn sử dụng.

+ Ghi các thông tin: ngày mở hộp sinh phẩm và số thanh còn lại sau khi xét nghiệm trên vỏ hộp

- Pha dung dịch rửa (tối thiểu 1 giờ trước khi rửa): pha loãng dung dịch R2 bằng nước cất hai lần theo tỷ lệ 1:20.

Lưu ý: Cân 800ml nước rửa IX để dùng cho 12 thanh phản ứng. Nếu không dùng hết ngay, cân ghi tên, loại xét nghiệm, số lô của bộ sinh phẩm, ngày hết hạn (2 tuần kể từ ngày pha) lên bình chứa và bảo quản ở 2-8°C

- Pha loãng dung dịch R9 trong R8 theo tỷ lệ 1:11 để được cơ chất hiện màu (R8+R9). Dung dịch đã pha chỉ ổn định 6 giờ trong bóng tối.

- Sắp xếp sơ đồ thí nghiệm(phụ lục).

- Tiến hành kỹ thuật.

Các bước tiến hành	Xét nghiệm định tính HBsAg
1	Để số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Dánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng.
4	Chuẩn bị dung dịch cộng hợp đã pha R6+R7.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Cho vào các giếng của phiến nhựa theo thứ tự sau: A1, B1, C1,D1 : 100 µl chứng âm(R3) E1: 100 µl chứng dương (R4) Từ giếng F1 trở đi : 100 µl mẫu huyết thanh bệnh nhân

Các bước tiến hành	Xét nghiệm định tính HBsAg
7	Nhỏ 50 µl dung dịch cộng hợp (R6+R7) vào tất cả các giếng (Lắc đều dung dịch cộng hợp trước khi sử dụng). Trộn đều hoàn toàn hỗn hợp bằng cách gõ nhẹ vào 4 cạnh của phiến nhựa.
8	Đậy紧密 và ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ trong 1 giờ 30 phút
9	Rửa phiến nhựa ít nhất 5 lần bằng dung dịch rửa. Làm khô bằng cách úp ngược phiến nhựa trên giấy thấm.
10	Pha dung dịch cơ chất TMB: 1R8+1R9
10	Nhỏ vào mỗi giếng 100 µl dung dịch hiện màu (R8+R9).
11	Ủ ở nhiệt độ $15-30^{\circ}\text{C}$ / $30 \pm 5$ phút tránh ánh sáng.
12	Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng của phiến. Lắc đều phiến nhựa. Đợi ít nhất 4 phút trước khi đọc kết quả.
13	Lau đáy tâm nhựa. Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm. Chỉ đọc kết quả trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

#### 4.3.4. Kiểm tra chất lượng

##### Điều kiện

- NC: Độ hấp phụ của chứng âm (R3).
- PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
- CO: Giá trị ngưỡng.
- $\text{NC}_x$ : Giá trị trung bình của chứng âm.
- $\text{NC} \leq 0,08$ .
- $\text{PC} \geq 1,000$ .
- $\text{NC}_x = \text{R3 OD} / 4$ .
- Loại chứng âm  $\text{NC} > 0,08$  hoặc  $\text{NC} > 40\% \text{NC}_x$ . Chỉ được loại 1 chứng âm và tiếp tục tính kết quả theo 3 chứng âm còn lại.

#### 4.3.5. Nhận định, trả lời kết quả

OD mẫu

$$\text{Tỷ lệ} = \frac{\text{OD mẫu}}{\text{Giá trị ngưỡng}}$$

$$\text{CO} = \text{NC}_x + 0,05$$

### **Kết quả**

- Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ < 1 được coi là âm tính.
- Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ ≥ 1 được làm lại. Nếu lần xét nghiệm thứ 2 giá trị tỷ lệ ≥ 1. Mẫu huyết thanh coi là dương tính.
  - Mẫu huyết thanh có  $0,9 < \text{tỷ lệ} < 1$ . xét nghiệm lại 2 lần:
    - + Giá trị tỷ lệ xét nghiệm lặp lại ≥ 1 : mẫu được coi là dương tính.
    - + Giá trị tỷ lệ xét nghiệm lặp lại có  $0,9 < \text{tỷ lệ} < 1$  : nên xét nghiệm lại cho bệnh nhân bằng phương pháp khác hoặc yêu cầu lấy lại bệnh phẩm.

**Lưu ý:** Kết quả không lặp lại thông thường là do:

- Rửa không đúng cách.
- Chứng âm bị nhiễm chéo bởi huyết thanh / huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
  - Chất nền bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá thuốc tẩy, ion kim loại...
  - Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

#### **4.3.6. Ưu – nhược điểm và ứng dụng**

##### **Ưu điểm**

- Độ nhạy và độ đặc hiệu cao >99%.
- Thực hiện được nhiều bệnh phẩm trong 1 lần xét nghiệm.
- Lưu trữ được kết quả.

##### **Nhược điểm**

- Phải có hệ thống máy thực hiện kỹ thuật (dàn máy ELISA). Chỉ thực hiện được ở những cơ sở y tế có đủ điều kiện trang thiết bị.
- Người thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật, người nhận định kết quả phải có kinh nghiệm chuyên môn.

#### **4.4. Phát hiện Anti-HBc Total bằng kỹ thuật ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Kỹ thuật miễn dịch gắn men)**

##### **4.4.1. Mục đích**

Phát hiện kháng thể tổng số kháng nguyên I/i của virus viêm gan B trong mẫu huyết thanh và huyết tương người.

##### **4.4.2. Nguyên lý**

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA.

#### 4.4.3. Quy trình xét nghiệm

##### 4.4.3.1. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân.

##### 4.4.3.2. Vật liệu/ Trang thiết bị sử dụng: tham khảo phần 4.3.3.2.

##### 4.4.3.3. Hoá chất, sinh phẩm

Bộ sinh phẩm Monolisa anti-HBc total Plus Bio-Rad gồm (VD):

R1	Khay vi lượng: 12 hàng 8 giếng được phủ kháng nguyên tái tổ hợp đã được tinh chế
R2	Dung dịch rửa đậm đặc (20 X)
R3	Huyết thanh chứng âm
R4	Huyết thanh chứng dương
R6	Dung dịch pha loãng mẫu
R7	Chất cộng hợp
R8	Dung dịch đệm cơ chất peroxidase: Dung dịch nacitrat và na acetat pH 4,0 chứa H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
R9	Chromogen: dung dịch chứa tetramethyl benzidin (TMB)
R10	Dung dịch dừng phản ứng: dung dịch acid sulfuric 1N

##### 4.4.3.4 Các bước thực hiện

###### Pha hoá chất chuẩn bị xét nghiệm

- Tham khảo hướng dẫn tại mục II-4.3.3.3 - theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Các bước thực hiện kỹ thuật

Các bước tiến hành	Xét nghiệm định tính Anti HBc
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lấy đủ số thanh (R1) cần sử dụng, gắn vào giá đỡ tương ứng được đặt trên giấy thấm.</li> <li>- Đánh số thứ tự các hàng tương ứng từ 1 đến 12 tùy theo số hàng cần sử dụng</li> <li>- Bảo quản các thanh chưa được sử dụng trong túi đựng. Khoá mép túi bằng dụng cụ chuyên dụng. Ghi hạn sử dụng các thanh (1 tháng kể từ ngày mở) lên túi đựng</li> <li>- Ghi các thông tin về ngày mở và số thanh còn lại của bộ sinh phẩm trên vỏ hộp</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nhỏ 200µl dung dịch pha loãng (R6) vào</li> </ul>

3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lần lượt nhỏ 20<math>\mu</math>l:</li> <li>+ Giếng A1, B1: chứng âm (R3)</li> <li>+ Giếng C1, D1, E1: chứng dương (R4)</li> <li>+ Nhũng giếng còn lại: mẫu thử</li> </ul> <p><u>Lưu ý:</u> chứng dương và chứng âm : hồ sau cùng</p> <p>Làm đồng nhất hỗn hợp bằng cách dùng pipet 20<math>\mu</math>l hút nhả ít nhất 3 lần hoặc vỗ nhẹ vào thành phiến nhựa.</p>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dán kín khay nhựa bằng giấy dán trong. Đè mạnh quanh viền khay nhựa để dán thật kín. Ủ khay nhựa ở <math>37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}</math> trong 30 phút <math>\pm 5</math> phút.</li> </ul>
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pha dung dịch nước rửa: pha loãng dung dịch nước rửa với nước cát hai lần ở độ pha loãng 1:20</li> </ul>
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bóc giấy dán trong và đặt phiến nhựa lên máy rửa. Chọn chương trình rửa thích hợp.</li> <li>- Làm khô lại khay nhựa bằng cách lật úp khay nhựa xuống giấy thấm và đập nhẹ nhàng.</li> </ul>
7	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nhanh chóng nhỏ 200<math>\mu</math>l dung dịch cộng hợp vào tất cả các giếng.</li> </ul>
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dán kín phiến nhựa bằng giấy dán trong và ủ 60 <math>\pm</math> 4 phút ở nhiệt độ <math>37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}</math></li> </ul>
9	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pha loãng dung dịch R9 trong R8 theo tỷ lệ 1: 11.</li> <li>- Dung dịch đã pha chỉ ổn định 6 giờ trong bóng tối.</li> </ul>
10	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bóc giấy dán trong và đặt phiến nhựa lên máy rửa. Chọn chương trình rửa thích hợp.</li> <li>- Làm khô lại khay nhựa bằng cách lật úp khay nhựa xuống giấy thấm và đập nhẹ nhàng</li> </ul>
11	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nhỏ nhanh vào mỗi giếng 100<math>\mu</math>l dung dịch hiện màu vừa pha.</li> <li>- Đè phản ứng xảy ra trong bóng tối, 30 <math>\pm</math> 4 phút ở nhiệt độ phòng (<math>18 - 30^{\circ}\text{C}</math>). Không sử dụng giấy dán trong ở giai đoạn ủ này.</li> </ul>
12	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nhỏ 100<math>\mu</math>l dung dịch dùng phản ứng (R10) vào mỗi giếng. Đồng nhất hỗn hợp phản ứng bằng cách gõ nhẹ vào thành phiến nhựa.</li> </ul>
13	<p>Lau đáy giếng bằng giấy mềm. Đọc kết quả trong vòng 30 phút và tối thiểu trong 2 phút sau dừng khi phản ứng trên máy đọc ở bước sóng 450/620 -690 nm.</p>

#### 4.4.4. Kiểm tra chất lượng

- Đối với chứng âm: mỗi giá trị hấp thụ đơn phải nhỏ hơn 0.100.
- Đối với chứng dương:
  - + Mỗi giá trị hấp thụ phải lớn hơn hoặc bằng 1.000 và nhỏ hơn hoặc bằng 2.400.

+ Nếu một giá trị của chứng dương nằm ngoài giới hạn này hoặc sai khác trên 30% giá trị trung bình, cần phải tính lại lần nữa với hai giá trị chứng dương còn lại.

Xét nghiệm nên được thực hiện lặp lại nếu có trên một giá trị chứng dương nằm ngoài các giới hạn ở trên.

#### 4.4.5. Ý nghĩa kết quả và báo cáo

Tính giá trị trung bình của độ hấp thụ đối với huyết thanh chứng dương (OD R4)

Tổng mật độ quang học

Giá trị trung bình OD R4 = \_\_\_\_\_  
3

Tính giá trị ngưỡng (CO)

CO =  $\frac{\text{Giá trị trung bình OD R4}}{5}$

Giải thích kết quả

- Các mẫu có giá trị OD < giá trị ngưỡng được coi là âm tính với xét nghiệm MONOLISA anti-HBc PLUS.

- Các mẫu có giá trị OD  $\geq$  giá trị ngưỡng được coi là dương tính ban đầu với xét nghiệm MONOLISA anti-HBc PLUS và phải được xét nghiệm lại bằng xét nghiệm tương tự trước khi đưa ra nhận định cuối cùng.

- Các kết quả nằm dưới giá trị ngưỡng CO – 10% < OD nêu được nhận định một cách thận trọng (nên thực hiện xét nghiệm lại các mẫu liên quan bằng xét nghiệm lặp lại 2 lần khi hệ thống sử dụng và quy trình thí nghiệm cho phép điều đó).

- Sau khi xét nghiệm lại, mẫu này được coi là dương tính với xét nghiệm MONOLISA anti-HBc PLUS nếu ít nhất một trong 2 lần đo cho kết quả dương tính, tức là cao hơn, hoặc bằng giá trị ngưỡng. Mẫu này được coi là âm

tính với xét nghiệm MONOLISA anti-HBc PLUS nếu cả hai giá trị đều thấp hơn giá trị ngưỡng.

#### 4.4.6. An toàn

Thực hiện theo đúng quy trình an toàn - Một số hoá chất có thể gây kích ứng da và mắt khi tiếp xúc như chất bảo quản proclin 300 và dung dịch hiện màu TMB, dung dịch dừng phản ứng  $H_2SO_4 - H_2SO_4 1N$  có thể gây bỏng khi tiếp xúc với da và niêm mạc mắt.

#### Ghi chú bổ sung

- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng. Tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ký hiệu	Định dạng
R1	Microplate: một phiến nhựa gồm 12 hàng, mỗi hàng 8 giếng có gắn kháng kháng thể anti-HBc IgM của người.
R2	Concentrated washing solution (20X): dung dịch rửa đậm đặc (20X).
R3	Negative control: chứng âm.
R4	Positive control: chứng dương.
R5	Sample diluent: dung dịch pha loãng bệnh phẩm.
R6	Lyophilized conjugate: kháng nguyên HBc cộng hợp enzyme peroxidase dạng đông khô.
R7	Conjugate diluent: dung dịch pha loãng cộng hợp.
R8	Substrate buffer: dung dịch đậm pha loãng cơ chất Peroxydase.
R9	Chromogen: dung dịch chứa tetramethyl benzidin (TMB).
R10	Stop solution: dung dịch dừng phản ứng (acid sulfuric 1N).

### 4.5. Phát hiện anti-HBc IgM trong huyết thanh/huyết tương bằng kỹ thuật ELISA

#### 4.5.1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng kháng nguyên lõi của virus viêm gan B (antiHBcIgM) trong mẫu huyết thanh/huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

#### 4.5.2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật ELISA.

#### 4.5.3. Quy trình xét nghiệm

##### 4.5.3.1. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân.

4.5.3.2. Vật liệu/ Trang thiết bị sử dụng: tham khảo phần 4.3.3.2.

4.5.3.3. Hoá chất, sinh phẩm

Bộ sinh phẩm Monolisa HBc IgM Plus Bio-Rad gồm (VD):

4.5.3.4. Quy trình

**Pha hoá chất chuẩn bị xét nghiệm**

- Tham khảo hướng dẫn 4.3.3.3 - tài liệu hướng dẫn của nhà sản xuất
- Các bước thực hiện kỹ thuật
  - + *Các bước tiến hành*

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti HBc IgM
1.	Pha dung dịch rửa: Pha loãng dung dịch R2 1:20 bằng nước cất hai lần.
2.	Pha loãng bệnh phẩm trong dung dịch pha loãng bệnh phẩm (R5) với tỷ lệ 1: 101 (10 µl huyết thanh + 1000 µl dung dịch R5).
3.	Lấy đủ số thanh (R1) cần sử dụng, gắn vào giá đỡ tương ứng được đặt trên giấy thám. Bảo quản các thanh chưa sử dụng trong túi đựng. Khoá mép túi bằng dụng cụ chuyên dụng. Ghi hạn sử dụng các thanh (1 tháng kể từ ngày mở) lên túi đựng. Ghi các thông tin về ngày mở và số thanh còn lại của bộ sinh phẩm trên vỏ hộp.
4.	Rửa phiến nhựa trên máy rửa bằng chương trình rửa phù hợp (2 lần)
5.	Nhỏ 100µl mẫu bệnh phẩm đã pha loãng theo thứ tự điền trong sơ đồ mẫu. Các chứng âm và chứng dương được nhỏ sau cùng Giếng A1, B1, C1: chứng âm (R3) Giếng D1, E1 và F1: chứng dương (R4) + 100µl mẫu bệnh phẩm 1 vào giếng G1 + Giếng còn lại: mẫu bệnh phẩm.
6.	Dán kín phiến nhựa bằng giấy dán trong. Đè mạnh quanh viền phiến nhựa để dán thật kín. Ủ phiến nhựa ở 37°C ± 1°C trong 30 phút ± 5 phút.

7.	<p>Pha dung dịch cộng hợp (R6 + R7).</p> <p>Nếu cần dùng ít hơn 6 thanh (R1): Nhỏ 6ml R7 vào 1 lọ R6.</p> <p>Nếu cần dùng nhiều hơn 6 thanh (R1): dùng 2 lọ (R6), nhỏ 6ml (R7) vào mỗi lọ R6.</p> <p>Chờ 2 phút rồi đảo trộn nhẹ nhàng dung dịch. Ghi ngày hết hạn (3 tuần kể từ ngày pha, bảo quản ở <math>2-8^{\circ}\text{C}</math>) lên lọ.</p>
8.	Bóc giấy dán trong và rửa phiến nhựa trên máy rửa tự động. Chọn chương trình rửa thích hợp để rửa lần 1 – Loại bỏ tối đa dung dịch rửa bằng cách lật úp phiến nhựa xuống giấy thấm.
9.	Nhỏ vào $100\mu\text{l}$ dung dịch cộng hợp (R6+R7) vào mỗi giếng.
10.	Dán kín phiến nhựa bằng giấy dán trong. Đè mạnh quanh viền phiến nhựa để dán thật kín. Ủ ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian $60 \pm 5$ phút
11.	Pha loãng dung dịch R9 trong R8 theo tỷ lệ 1:11 để được dung dịch cơ chất hiện màu (R8 + R9). Dung dịch đã pha chỉ ổn định 6 giờ trong bóng tối.
12.	Bóc giấy dán trong và rửa phiến nhựa trên máy rửa tự động. Chọn chương trình rửa phù hợp để rửa lần 2. Loại bỏ tối đa dung dịch rửa bằng cách đập úp phiến nhựa xuống giấy thấm và đập nhẹ nhàng.
13.	Nhanh chóng nhỏ $80\mu\text{l}$ dung dịch cơ chất hiện màu (R8 + R9) vào mỗi giếng.
14.	Ủ phiến nhựa trong bóng tối khoảng $30 \pm 5$ phút ở nhiệt độ phòng. Không sử dụng giấy dán ở giai đoạn ủ này.
15.	Nhỏ $100\mu\text{l}$ dung dịch dùng phản ứng màu (R10) vào mỗi giếng. Đồng nhất hỗn hợp phản ứng bằng cách gõ nhẹ vào thành phiến nhựa.
16.	Lau đáy giếng bằng giấy mềm. Đọc kết quả ở bước sóng kép $450/620\text{nm}$ trong vòng 30 phút và tối thiểu 4 phút sau khi dùng phản ứng.

#### 4.5.4. Kiểm tra chất lượng

- Giá trị trung bình chứng dương phải  $\geq 0.400$ .
- Nếu một giá trị của chứng dương nằm ngoài giới hạn này hoặc sai khác trên 25 % giá trị trung bình, cần phải tính lại lần nữa với hai giá trị chứng dương còn lại.

- Giá trị trung bình chứng âm phải  $\leq 0.100$ .

#### 4.5.5. Ý nghĩa kết quả và báo cáo

- Tính giá trị trung bình của chứng âm (OD R3):

$$\overline{ODR3} = \text{Tổng của OD R3}/3$$

- Tính giá trị trung bình của chứng dương (OD R4):

$$\overline{ODR4} = \text{Tổng của OD R4}/3$$

- Tính giá trị ngưỡng (CO)

$$CO = \overline{ODR3} + (\overline{ODR4}/7)$$

- Giá trị của thử nghiệm

Tính tỷ số mẫu

$$\text{Tỷ số mẫu} = OD \text{ mẫu}/CO$$

Giải thích kết quả

- Các mẫu có tỷ số mẫu nhỏ hơn 1 được coi là âm tính với anti-HBc IgM.
- Các mẫu có tỷ số mẫu  $\geq 1$  được coi là dương tính với anti-HBc IgM.

#### 4.5.6. An toàn

Thực hiện theo đúng quy trình an toàn. Một số hoá chất có thể gây kích ứng da và mắt khi tiếp xúc như dung dịch hiện màu TMB, dung dịch dừng phản ứng  $H_2SO_4 - H_2SO_4 1N$  có thể gây bỏng khi tiếp xúc với da và niêm mạc mắt.

*Ghi chú bổ sung: không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng. Tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất.*

### 4.6. Xét nghiệm HBeAg và anti-HBe bằng kỹ thuật Elisa

#### 4.6.1. Mục đích

Mục đích xác định định tính kháng nguyên HBeAg trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

#### 4.6.2. Nguyên lý

Kỹ thuật dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA.

#### 4.6.3. Phương pháp làm xét nghiệm

##### 4.6.3.1 Bệnh phẩm

##### 4.6.3.2 Vật liệu/Trang thiết bị sử dụng; tham khảo phần 4.3.3.2

- Trang thiết bị.
- Dụng cụ và vật tư tiêu hao.
- Hoá chất, sinh phẩm:

Bộ sinh phẩm MONOLISA HBeAg/Ab Plus Bio-Rad (VD)

<i>Ký hiệu</i>	<i>Định dạng</i>
R1	Một phiến nhựa phản ứng: 12 thanh, 8 giếng/thanh
R2	Concentrated washing solution 20X (R2): Dung dịch nước rửa đậm đặc (20X)
R3	Negative control: chứng âm
R4	Anti HBe Positive control: chứng dương cho anti-HBe
R5	HBeAg positive control: chứng dương cho HBeAg
R6	Neutralizing HBe antigen: kháng nguyên trung hoà
R7a	Conjugate: kháng thể cộng hợp enzym dùng cho xét nghiệm anti-HBe
R7b	Conjugate: kháng thể cộng hợp cho xét nghiệm HBeAg
R8	Substrate buffer: dung dịch đậm đặc pha loãng cơ chất
R9	Chromogen: dung dịch chứa Tetramethyl benzidine là cơ chất hiện màu phản ứng với enzyme peroxidase
R10	Stopping reagent: dung dịch dừng phản ứng hiện màu giữa cơ chất với enzyme peroxidase

4.6.3.3. Quy trình

**Quy trình thực hiện**

<i>Các bước</i>	<i>Xét nghiệm định tính HBeAg</i>
1	Lấy đủ số thanh (R1) cần sử dụng, gắn vào giá đỡ tương ứng được đặt trên giấy thấm. Bảo quản các thanh chưa được sử dụng trong túi đựng. Khoá mép túi bằng dụng cụ chuyên dụng. Ghi hạn sử dụng các thanh (3 tháng kể từ ngày mở) lên túi đựng.
2	Nhỏ 100µl mẫu bệnh phẩm theo thứ tự điền trên sơ đồ mẫu. Nhỏ chứng dương và chứng âm sau cùng Các giếng A1, B1 và C1: chứng âm (R3) Giếng, D1: chứng dương (R5) Những giếng còn lại: mẫu
3	Dán kín phiến nhựa bằng giấy dán trong. Đè mạnh quanh viền

Các bước	Xét nghiệm định tính HBeAg
	phiến nhựa để dán thật kín. Ủ phiến nhựa ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 3 giờ $\pm 10$ phút.
4	Pha dung dịch rửa tối thiểu 1 giờ trước khi sử dụng: pha loãng dung dịch R2 bằng nước cất hai lần ở nồng độ 1:20
5	- Pha dung dịch cộng hợp: tính thể tích dung dịch cần dùng, pha loãng dung dịch R7b trong dung dịch R2 theo tỷ lệ 1:5
6	- Bóc giấy dán trong ra khỏi phiến nhựa và đặt vào máy rửa tự động. Chọn chương trình rửa phù hợp để rửa - Loại bỏ tối đa dung dịch nước rửa bằng cách lật úp phiến nhựa xuống giấy thấm và đập nhẹ nhàng.
7	Nhanh chóng nhỏ 100 $\mu\text{l}$ dung dịch R7b đã được pha vào mỗi giếng.
8	Dán kín phiến nhựa bằng giấy dán trong. Đè mạnh quanh viền phiến nhựa để dán thật kín. Ủ phiến nhựa ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 30 phút $\pm 5$ phút.
9	Pha dung dịch cơ chất: Pha loãng cơ chất R9 trong R8 theo tỷ lệ 1: 11. Dung dịch chỉ ổn định trong bóng tối khoảng 6 giờ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối.
10	Bóc giấy dán trong ra khỏi phiến nhựa và đặt vào máy rửa tự động. Chọn chương trình rửa phù hợp để rửa. Loại bỏ tối đa dung dịch nước rửa bằng cách lật úp phiến nhựa xuống giấy thấm và đập nhẹ nhàng.
11	Nhanh chóng nhỏ vào mỗi giếng 80 $\mu\text{l}$ dung dịch cơ chất hiện màu Đέ phiến nhựa trong bóng tối khoảng 30 $\pm 5$ phút ở nhiệt độ phòng ( $18 - 30^{\circ}\text{C}$ ). Không sử dụng giấy dán trong ở giai đoạn này.
12	Nhanh chóng nhỏ 100 $\mu\text{l}$ dung dịch dừng phản ứng (R10) vào mỗi giếng. Đồng nhất hỗn hợp phản ứng bằng cách gõ nhẹ vào thành phiến nhựa.
13	Lau đáy các giếng bằng giấy mềm. Đọc kết quả trong vòng 30 phút và tối thiểu 4 phút sau khi dừng phản ứng tại bước song

Các bước	Xét nghiệm định tính HBeAg
	kép 450/620 -700 nm. Kiểm tra sự giống nhau giữa đọc bằng quang phổ kế và bằng mắt thường và so với sơ đồ phân phôi và định danh mẫu.
14	Bảo quản bộ sinh phẩm nếu còn ở 2 - 8°C.

#### 4.6.4. Kiểm tra chất lượng

- NC: Độ hấp phụ của chứng âm (R3).
- PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
- CO: Giá trị ngưỡng.
- $NC_x$ : Giá trị trung bình của chứng âm.
- $NC_x = R3 \text{ OD} / 3$ .
- Loại chứng âm lớn hơn 25% giá trị trung bình chứng âm. Chỉ được loại 1 chứng âm và tính kết quả theo 2 chứng âm còn lại.
- $CO = NC_x + 0,025$ .
- $NC_x < 0,060$ .
- $PC > 0,800$ .

OD mẫu

$$\text{Tỷ lệ} = \frac{\text{OD mẫu}}{\text{Giá trị ngưỡng}}$$

#### 4.6.5. Ý nghĩa kết quả và báo cáo

- Mẫu huyết thanh:
- + Dương tính: khi có giá trị tỷ lệ  $\geq 1$ .
- + Âm tính: khi có giá trị tỷ lệ  $< 1$ .
- Trường hợp dương tính nên xét nghiệm lại 2 giếng. Nếu có ít nhất 1 giá trị dương, mẫu được coi là dương tính.

#### 4.6.6. An toàn

Thực hiện theo đúng quy trình an toàn - Một số hoá chất có thể gây kích ứng da và mắt khi tiếp xúc như chất bảo quản proclin 300 và dung dịch hiện màu TMB, dung dịch dừng phản ứng  $H_2SO_4 - H_2SO_4 1N$  có thể gây bỏng khi tiếp xúc với da và niêm mạc mắt.

*Ghi chú bổ sung: không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng. Tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất.*

#### **4.7. Xác định anti-HBe bằng kỹ thuật ELISA**

##### **4.7.1. Mục đích**

Xác định định tính kháng thể tổng số kháng kháng nguyên HBeAg trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

##### **4.7.2. Nguyên lý**

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật ELISA.

##### **4.7.3. Phương pháp làm xét nghiệm**

###### **4.7.3.1 Bệnh phẩm**

Huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân.

4.7.3.2 Vật liệu/trang thiết bị sử dụng: tham khảo phần 4.3.3.2.

###### **4.7.3.3 Quy trình**

- Sắp xếp sơ đồ thí nghiệm

- Quy trình thực hiện:

Bước	Xét nghiệm định tính anti-HBe
1	Lấy đủ số thanh (R1) cần sử dụng, gắn vào giá đỡ tương ứng được đặt trên giấy thấm. - Bảo quản các thanh chưa được sử dụng trong túi đựng. Khoá mép túi bằng dụng cụ chuyên dụng. Ghi hạn sử dụng các thanh (3 tháng kể từ ngày mở) lên túi đựng. - Ghi các thông tin về ngày mở và số thanh còn lại sau khi mở của bộ sinh phẩm trên vỏ hộp.
2	Nhỏ 100 $\mu$ l mẫu theo thứ tự điền trong sơ đồ mẫu. Chứng âm và chứng dương nhỏ sau cùng. Giếng A1, B1, C1: chứng âm (R3) Giếng D1: chứng dương (R4) Những giếng còn lại: mẫu bệnh phẩm
3	Nhanh chóng nhỏ 50 $\mu$ l dung dịch kháng nguyên trung hoà (R6) vào mỗi giếng. Gõ nhẹ vào thành phiến nhựa hoặc pipet lên xuống 2 – 3 lần để đồng nhất hỗn hợp phản ứng.
4	- Dán kín phiến nhựa bằng giấy dán trong. Đè mạnh quanh viền phiến nhựa để dán thật kín. Ủ phiến nhựa ở 37 ± 1°C trong thời gian 3 giờ ± 10 phút.

Bước	Xét nghiệm định tính anti-HBe
5	Pha dung dịch rửa tối thiểu 1 giờ trước khi sử dụng; pha loãng dung dịch R2 bằng nước cất hai lần ở nồng độ 1:20.
6	Pha dung dịch cộng hợp: tính thể tích dung dịch cần dùng, pha loãng dung dịch R7a trong dung dịch R2 theo tỷ lệ 1:5.
7	Bóc giấy dán trong ra khỏi phiến nhựa và đặt vào máy rửa tự động. Chọn chương trình rửa phù hợp để rửa. Loại bỏ tối đa dung dịch nước rửa bằng cách lật úp phiến nhựa xuống giấy thấm và đập nhẹ nhàng.
8	Nhanh chóng nhỏ vào mỗi giếng 100 µl dung dịch cộng hợp R7a đã pha.
9	Dán kín phiến nhựa bằng giấy dán trong. Đe mạnh quanh viền phiến nhựa để dán thật kín. Ủ phiến nhựa ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 30 phút $\pm$ 5 phút.
10	Pha dung dịch cơ chất: Pha loãng cơ chất R9 trong R8 theo tỷ lệ 1: 11. Dung dịch chỉ ổn định trong bóng tối khoảng 6 giờ ở nhiệt độ phòng.
11	Bóc giấy dán trong ra khỏi phiến nhựa và đặt vào máy rửa tự động. Chọn chương trình rửa phù hợp để rửa Loại bỏ tối đa dung dịch nước rửa bằng cách lật úp phiến nhựa xuống giấy thấm và đập nhẹ nhàng.
12	Nhanh chóng nhỏ vào mỗi giếng 80µl dung dịch cơ chất hiện màu Đe phiến nhựa trong bóng tối khoảng $30 \pm 4$ phút ở nhiệt độ phòng ( $18 - 30^{\circ}\text{C}$ ). Không sử dụng giấy dán trong ở giai đoạn này
13	Nhanh chóng nhỏ 100µl dung dịch dừng phản ứng (R10) vào mỗi giếng. Đóng nhất hỗn hợp phản ứng bằng cách gõ nhẹ vào thành phiến nhựa.
14	Lau đáy các giếng bằng giấy mềm. Đọc kết quả trong vòng 30 phút và tối thiểu 4 phút sau khi dừng phản ứng tại bước sóng kép $450/620 - 700$ nm. Kiểm tra sự giống nhau giữa đọc bằng quang phổ kế và bằng mắt thường và so với sơ đồ phân phối và định danh mẫu.
15	Bảo quản bộ sinh phẩm nếu còn ở $2 - 8^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.7.4. Kiểm tra chất lượng

- NC: Độ hấp phụ của chứng âm (R3).
- PC: Độ hấp phụ của chứng dương.

- CO: Giá trị ngưỡng.
- NC<sub>x</sub>: Giá trị trung bình của chứng âm.
- NC<sub>x</sub> = R3 OD / 3.
- Loại chứng âm lớn hơn 25% giá trị trung bình chứng âm. Chỉ được loại 1 chứng âm và tính kết quả theo 2 chứng âm còn lại.
  - CO = NC<sub>x</sub> x 0,4.
  - NC<sub>x</sub> > 0,900.
  - PC < 0,150.

$$\text{Tỷ lệ} = \frac{\text{OD mẫu}}{\text{Giá trị ngưỡng}}$$

#### 4.7.5. Ý nghĩa kết quả và báo cáo

- Mẫu huyết thanh:
  - + Dương tính: khi có giá trị tỷ lệ  $\leq 0,9$ .
  - + Âm tính: khi có giá trị tỷ lệ  $> 1,1$ .
- Tuy nhiên, thận trọng khi  $0,9 < \text{giá trị tỷ lệ} < 1,1$ . Nên làm lại xét nghiệm.
- Trường hợp dương tính nên xét nghiệm lại 2 giêng. Nếu có ít nhất 1 giá trị dương, mẫu được coi là dương tính.

Kết quả không lặp lại thông thường là do:

- Rửa không đúng cách.
- Chứng âm bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Chất nền bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá: thuốc tẩy, ion kim loại...
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

#### 4.7.6. An toàn

Thực hiện theo đúng quy trình an toàn. Một số hoá chất có thể gây kích ứng da và mắt khi tiếp xúc như chất bảo quản proclin 300 và dung dịch hiện màu TMB, dung dịch dừng phản ứng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N có thể gây bỏng khi tiếp xúc với da và niêm mạc mắt.

*Ghi chú bổ sung: không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng. Tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất.*

#### **4.8. Xét nghiệm anti-HBs định tính bằng kỹ thuật ELISA**

##### **4.8.1. Mục đích**

Xét nghiệm định tính kháng thể tổng số kháng thể anti-HBs trong máu huyết thanh và huyết tương người.

##### **4.8.2. Nguyên lý**

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật ELISA.

##### **4.8.3 Phương pháp làm xét nghiệm**

###### **4.8.3.1 Bệnh phẩm**

Huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân.

###### **4.8.3.2 Vật liệu/trang thiết bị sử dụng: tham khảo phần 4.3.3.2**

- Trang thiết bị
- Dụng cụ và vật tư tiêu hao
- Hoá chất, sinh phẩm:

R1	Phiên nhựa : 12 thanh, 8 giếng/thanh
R2	Concentrated washing solution: dung dịch rửa đậm đặc (20X)
CO	AntiHBs negative control: chứng âm
C1	10mIU/ml Calibrator: mẫu chuẩn có nồng độ 10mIU/ml
C2	100 mIU/ml Calibrator: mẫu chuẩn có nồng độ 100mIU/ml
C3	400 mIU/ml Calibrator: mẫu chuẩn có nồng độ 400mIU/ml
C4	1000 mIU/ml Calibrator: mẫu chuẩn có nồng độ 1000mIU/ml
R6	Speciment diluent: dung dịch pha loãng bệnh phẩm
R7a	:Concentrated conjugate 11X: chất cộng hợp đậm đặc (11X)
R7b	Conjugate diluent: dung dịch pha loãng chất cộng hợp
R8	Substrate buffer: dung dịch đậm pha loãng cơ chất
R9	Chromogen pink coloured: dung dịch chứa tetramethyl benzidin (TMB) là cơ chất hiện màu phản ứng với enzyme peroxidase
R10	Stopping solution: dung dịch dừng phản ứng hiện màu giữa enzyme và cơ chất.

#### 4.8.3.3 Quy trình thực hiện

Bước	Xét nghiệm Anti- HBs
1	Lấy số giếng cần sử dụng, gắn vào giá đỡ tương ứng được đặt trên giấy thấm. - Bảo quản các thanh chưa được sử dụng trong túi đựng. Khoá mép túi bằng dụng cụ chuyên dụng. Ghi hạn sử dụng các thanh (1 tháng kể từ ngày mở) lên túi đựng. - Ghi các thông tin về ngày mở và số thanh còn lại của bộ sinh phẩm trên vỏ hộp.
2	Nhỏ 25 $\mu$ l dung dịch loãng bệnh phẩm (R6) vào mỗi giếng. <u>Lưu ý: lắc nhẹ dung dịch trước khi sử dụng</u>
3	Lần lượt nhỏ 75 $\mu$ l mẫu: Giếng A1: chứng âm (CO) Giếng B1, C1, D1: mẫu chuẩn (C1) Giêng E1: chứng dương (C2) Những giếng còn lại: mẫu Đóng nhất hồn hợp phản ứng bằng cách hút pipet lên xuống 2 - 3 lần hoặc gõ nhẹ vào thành phiến nhựa, tránh tạo bọt.
4	Dán kín phiến nhựa bằng giấy dán trong. Đè mạnh quanh viền phiến nhựa để dán thật kín. Ủ phiến nhựa ở 37°C ± 2°C trong thời gian 60 ± 5 phút.
5	Pha loãng dung dịch rửa dung dịch R2 bằng nước cát hai lần ở nồng độ 1:20.
3	Chuẩn bị dung dịch kháng nguyên cộng hợp enzyme: tính thể tích dung dịch cần dùng, pha loãng dung dịch R7a trong trong 7b theo tỷ lệ 1:11.
4	Bóc giấy dán trong ra khỏi khay nhựa và đặt vào máy rửa tự động. Chọn chương trình rửa phù hợp để rửa lần 1 - Làm khô lại khay nhựa bằng cách lật úp khay nhựa xuống giấy thấm.
5	Nhanh chóng nhỏ 100 $\mu$ l dung dịch cộng hợp (R7a + R7b đã được pha vào mỗi giếng).
6	Dán kín phiến nhựa bằng giấy dán trong. Đè mạnh quanh viền phiến nhựa để dán thật kín. Ủ phiến nhựa ở 37°C ± 1°C trong thời gian 60 phút ± 5 phút.

Bước	Xét nghiệm Anti- HBs
7	Chuẩn bị dung dịch cơ chất (R8+R9): Pha loãng cơ chất R9 trong R8 theo tỷ lệ 1: 11. Dung dịch chỉ ổn định trong bóng tối khoảng 6 giờ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối.
8	- Bóc giấy dán trong ra khỏi phiến nhựa và đặt vào máy rửa tự động. Chọn chương trình rửa phù hợp để rửa. - Loại bỏ tối đa dung dịch nước rửa bằng cách lật úp phiến nhựa xuống giấy thấm và đập nhẹ nhàng.
9	Nhanh chóng nhỏ vào mỗi giếng 100µl dung dịch cơ chất hiện màu (R8 + R9) vào mỗi giếng. Đề phản ứng xảy ra trong tối $30 \pm 5$ phút ở nhiệt độ phòng ( $18 - 30^{\circ}\text{C}$ ). Không dùng giấy dính trong lần ủ này
10	Nhanh chóng nhỏ 100µl dung dịch dừng phản ứng (R10 vào mỗi giếng. Đồng nhất hỗn hợp phản ứng bằng cách gõ nhẹ vào thành phiến nhựa).
11	Lau sạch đáy phiến nhựa bằng giấy mềm. Đọc kết quả trong vòng 30 phút và tối thiểu 4 phút sau dừng phản ứng ở 450/620 -700 nm và ở bước sóng 405/620 -700 nm bằng máy đọc ELISA.
12	Kiểm tra sự giống nhau giữa đọc bằng quang phổ kế và bằng mắt thường và so với sơ đồ phân phôi và định danh mẫu.
13	Bảo quản bộ sinh phẩm (nếu còn) ở $2-8^{\circ}\text{C}$ . Lau dọn vệ sinh khu vực làm xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng.

#### 4.8.4. Kiểm tra chất lượng

- Giá trị trung bình của Calibrator 10 mIU/ml (C1) là giá trị ngưỡng của phản ứng (Cutoff Value).
  - Độ hấp phụ của chứng âm phải  $0,000 < \text{OD}_{\text{C}0} \leq 0,070$ .
  - Độ hấp phụ của chứng dương C2 phải  $\text{OD}_{\text{C}0} \geq 0,400$ .
  - Nếu một trong các giá trị của chứng âm hoặc chứng dương ở ngoài khoảng cho phép thì phản ứng không có giá trị và phải làm lại.
  - Độ hấp phụ của Calibrator 10 mIU/ml phải  $0,050 \leq \text{OD}_{\text{C}1} \leq 0,200$  và  $\text{OD}_{\text{C}1} \geq (1,5 \times \text{OD}_{\text{C}0})$ .

Nếu một trong hai giá trị của Calibrator 10 mIU/ml (C1)  $\text{OD}_{\text{C}1}$  ở ngoài khoảng cho phép thì phản ứng không có giá trị và phải làm lại.

#### *4.8.5. Tính toán kết quả và biện luận*

Sự có mặt hay không có mặt của anti-HBs được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng.

##### **Biện luận kết quả**

- Kết quả âm tính: Mẫu thử có OD < C.O được coi như âm tính với MONOLISA Anti-HBs PLUS.
- Kết quả dương tính: Mẫu thử có OD ≥ C.O được coi như dương tính với MONOLISA Anti-HBs PLUS.

#### *4.8.6. An toàn*

Thực hiện theo đúng quy trình an toàn - Một số hoá chất có thể gây kích ứng da và mắt khi tiếp xúc như chất bảo quản proclin 300 và dung dịch hiện màu TMB, dung dịch dừng phản ứng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N có thể gây bỏng khi tiếp xúc với da và niêm mạc mắt.

Bài 29

**CHẨN ĐOÁN VIÊM NÃO NHẬT BẢN**

(Japanese Encephalitis Virus)

**Mục tiêu**

1. *Trình bày được đặc điểm, dịch tễ học của virus viêm não Nhật Bản.*
2. *Nêu các phương pháp chẩn đoán virus viêm não Nhật Bản.*

**1. Đại cương**

Viêm não Nhật Bản (VNNB) là một bệnh nhiễm trùng cấp tính gây ra bởi virus viêm não Nhật Bản (VNNB) thuộc nhóm B (Flavivirus) của Arbovirus (nên còn được gọi là virus viêm não Nhật Bản B) có ái tính với tế bào thần kinh. Virus lây truyền qua người nhờ trung gian của côn trùng tiết tủy là muỗi. Bệnh có thể xảy ra rải rác thành dịch và thường gặp ở lứa tuổi dưới 15.

Virus VNNB có kháng nguyên chung với những virus cùng nhóm Flavivirus do đó trong phản ứng ngăn ngưng kết hồng cầu dễ có phản ứng chéo, nhưng phản ứng ELISA ít có phản ứng chéo hơn.

**2. Đáp ứng miễn dịch của cơ thể trong nhiễm virus VNNB**

Ngay sau khi nhiễm virus, kháng thể IgM xuất hiện rất sớm và tồn tại khoảng 60-90 ngày. Nếu bị nhiễm virus lần sau IgM cũng được tổng hợp sớm rồi giảm dần và biến mất rất nhanh như lần đầu. Do vậy, việc chẩn đoán huyết thanh học xác định kháng thể IgM kháng virus VNNB là bằng chứng chắc chắn của sự mới nhiễm.

Kháng thể IgG xuất hiện muộn hơn nhưng tồn tại trong một thời gian dài, có thể suốt đời và có vai trò chính trong việc bảo vệ cơ thể.

**3. Chẩn đoán vi sinh**

**3.1. Phân lập virus**

Thường chỉ phân lập virus từ não tử thi, ít khi phân lập được từ máu bệnh nhân, dịch não tuỷ bệnh nhân.

### **3.2 Chẩn đoán huyết thanh**

Dựa vào đặc điểm hình thành các loại kháng thể của cơ thể ở những thời điểm khác nhau để sử dụng các phương pháp chẩn đoán thích hợp. Có nhiều kỹ thuật huyết học để chẩn đoán VNNB như kỹ thuật ức chế ngưng kết hồng cầu, kỹ thuật kết hợp bổ thể, kỹ thuật trung hoà, kỹ thuật MAC-ELISA. Trong đó kỹ thuật MAC-ELISA thường được sử dụng để phát hiện kháng thể IgM kháng virus viêm não Nhật Bản trong huyết thanh bệnh nhân ở các vụ dịch viêm não.

#### **4. Kỹ thuật Mac-ELISA chẩn đoán viêm não Nhật Bản**

*Sử dụng bộ sinh phẩm MAC-ELISA chẩn đoán viêm não Nhật Bản của Viện vệ sinh dịch tễ trung ương*

##### **4.1. Mục đích**

Dùng để phát hiện IgM kháng virus viêm não Nhật Bản trong huyết thanh hoặc dịch não tuỷ bệnh nhân. Kỹ thuật MAC-ELISA giúp cho việc xác định sự đang nhiễm hoặc vừa mới nhiễm virus viêm não Nhật Bản.

##### **4.2. Nguyên lý**

Thử nghiệm này sử dụng kháng nguyên virus VNNB để thu bắt kháng thể IgM kháng virus VNNB trong mẫu huyết thanh.

##### **4.3. Quy trình thực hiện**

###### **4.3.1 Vật tư trang thiết bị cần thiết**

- Nước cất hai lần.
- Pipet: 10-100-1000 $\mu$ l.
- Ống đong 500ml hoặc 1000ml.
- Hệ thống máy rửa, máy ủ, máy đọc ELISA.
- Giấy thấm nước.
- Các ống nghiệm và giá để ống nghiệm.
- Găng tay.
- Thùng huỷ dụng cụ.

###### **4.3.2. Thành phần bộ sinh phẩm**

Gồm các dụng cụ hoá chất, dung dịch cần thiết để thực hiện kỹ thuật.

TT	Nội dung	Bảo quản
1	Thanh nhựa dày băng 2x8 giếng gắn kháng thể kháng IgM người đặc hiệu chuỗi $\mu$ .	< 0°C
2	Kháng nguyên đông khô: kháng nguyên viêm não Nhật Bản chủng Nakayama chế tạo bằng phương pháp Sucrose-axetol.	< 0°C
3	Chứng dương đông khô: huyết thanh người có IgM kháng virus viêm não Nhật Bản.	< 0°C
4	Chứng âm: huyết thanh người không có IgM và IgG kháng virus viêm não Nhật Bản.	< 0°C
5	Cộng hợp: IgG chuột kháng virus viêm não Nhật Bản chủng Nakayama gắn enzym peroxydase	< 0°C
6	Cơ chất hiện màu: 2mg Ortho-Phenylendiamin (OPD) tinh thể.	
7	Dung dịch đệm pha cơ chất: 4ml dung dịch đệm photphat citrat có chứa 0,03% hydrogenperoxyde.	
8	PBS-T (x10): 25ml.	
9	Dung dịch pha loãng: 20ml PBS pH.7,2, BSA, đỏ phenol, 0,1% tween.	
10	Dung dịch dừng phản ứng: 2ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .4N.	

#### 4.3.3 Bệnh phẩm

Huyết thanh nhưng tốt nhất là dịch não tuỷ.

##### *Thời gian lấy mẫu; có thể lấy ngay ngày đầu tiên của bệnh*

IgM kháng virus viêm não Nhật Bản có thể phát hiện sớm ngay ngày đầu của bệnh (70-80%) và thông thường tồn tại khoảng 30-90 ngày sau khi mắc. Để xác định sự nhiễm gần đây của virus viêm não Nhật Bản, chỉ cần lấy 1 mẫu đơn máu hoặc dịch não tuỷ (những trường hợp lấy mẫu trong 3 ngày đầu của bệnh, nếu kết quả âm tính, nên lấy máu lần 2 kiểm tra lại tránh bỏ sót). Huyết thanh trên tách sớm và để trong điều kiện đông băng, nếu để ở 4°C thì không nên để quá 7 ngày.

#### 4.3.4 Các bước thực hiện

Các bước chuẩn bị dung dịch, sinh phẩm, mẫu xét nghiệm

Bước	Nội dung các bước pha dung dịch, sinh phẩm, mẫu xét nghiệm
<b>Chuẩn bị dung dịch</b>	
1	Pha dung dịch PBS-Tween: dung dịch PBS-Tween đặc 10 lần, cho nước cát vừa đủ 250ml dùng để rửa bát nhựa.
2	Pha dung dịch cơ chất (chỉ chuẩn bị trước khi vào phản ứng khoảng 5 phút). Cho 4ml dung dịch pha cơ chất (dung dịch photphat citrat có chứa 0,03% hydrogenperoxide) vào 2mg OPD lắc kỹ cho tan ( <i>chú ý tránh ánh sáng</i> ).
<b>Chuẩn bị sinh phẩm</b>	
Các sinh phẩm được pha trong trước khi sử dụng 10 phút ( <i>nên sử dụng sau khi pha trong vòng 24 giờ</i> )	
1	Pha chứng dương và chứng âm: cho 2ml dung dịch pha loãng vào mỗi lọ mẫu chứng, lắc nhẹ cho tan, để ở 4°C.
2	Pha kháng nguyên: Kháng nguyên đông khô được pha trong 1ml dung dịch pha loãng, lắc nhẹ cho tan, để ở 4°C.
3	Pha cộng hợp: cộng hợp được pha trong 1ml dung dịch pha loãng, lắc nhẹ cho tan, để ở 4°C.
<b>Pha mẫu xét nghiệm</b>	
1	Huyết thanh bệnh nhân được pha 1/100. 10µl HT + 990 µl dung dịch pha loãng.
2	Dịch não tuỷ bệnh nhân pha 1/10. 100µl DNT + 900 µl dung dịch pha loãng.

Các bước thực hiện kỹ thuật

Bước	Nội dung thực hiện
1	Lấy thanh nhựa để vào khung giữ, 2x3 giếng được yêu cầu cho chứng dương, chứng âm, chứng PBS. Các mẫu thử và các mẫu chứng sau khi pha cho mẫu vào giếng vi lượng micro strips, 100 µl/giếng, cho dung dịch pha loãng vào giếng Blank.

Bước	Nội dung thực hiện
2	Ü bǎn nhựa 37°C/1 giờ.
3	Loại bỏ mẫu chứng và mẫu thử.
4	Rửa bǎn nhựa: cho dung dịch rửa (PBS-T) vào đầy các giếng (300 µl) để khoảng 1 phút, đổ dung dịch rửa (làm nháć lại 3 lần).
5	Ü bǎn nhựa 37°C/1 giờ hoặc 4°C qua đêm.
6	Loại bỏ kháng nguyên virus: rửa 3 lần như bước 3
7	Cho dung dịch đậm pha cơ chất: Dung dịch đậm pha cơ chất được chuẩn bị theo hướng dẫn trên ( <i>cần tránh ánh sáng</i> ), cho vào mỗi giếng 100 µl.
8	Ü ở nhiệt độ phòng xét nghiệm (20°C -25°C) tránh ánh sáng.
9	Sau 10 phút kiểm tra sự chuyển màu của các giếng mẫu chứng dương và các mẫu thử có IgM kháng virus viêm não Nhật Bản sẽ có sự chuyển màu sang màu vàng, mẫu chứng âm và các mẫu thử không có IgM kháng virus viêm não Nhật Bản không xuất hiện màu.
10	Dừng phản ứng: khi có sự xuất hiện màu khác biệt giữa mẫu chứng dương và mẫu chứng âm. Dừng phản ứng bằng dung dịch H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . 4N cho vào mỗi giếng 75 µl.
11	Đọc phản ứng bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 492nm/620nm.

#### 4.4. Kiểm tra chất lượng

- Điều kiện các chứng: giá trị ngưỡng là 2.

OD chứng dương

$$\frac{\text{OD chứng dương}}{\text{OD chứng âm}} \geq \text{giá trị ngưỡng}$$

OD chứng âm

- OD blank = OD chứng âm  $\leq 0.200$

#### 4.5. Nhận định, trả lời kết quả

- Các mẫu thử dương tính khi:

OD mẫu thử

$$\frac{\text{OD mẫu thử}}{\text{OD chứng âm}} \geq \text{giá trị ngưỡng}$$

OD chứng âm

- Đúng, vì kỹ thuật xét nghiệm MAC-ELISA:
  - + Có khả năng cho kết quả sớm (từ mẫu máu hoặc DNT lấy ngày thứ 3-4 của bệnh).
  - + Chỉ cần một mẫu xét nghiệm đơn, không cần lấy mẫu lần thứ 2.
  - + Có thể loại trừ phản ứng chéo giữa VNNB và virus Dengue (trong cùng nhóm virus Flavi).
  - + Kỹ thuật dễ thực hiện, không quá tốn kém; trang bị xét nghiệm hiện có ở hầu hết tuyến tính.

## Bài 30

# CHẨN ĐOÁN BỆNH GIANG MAI BẰNG CÁC KỸ THUẬT HUYẾT THANH HỌC (*Treponema pallidum*)

### Mục tiêu

1. Trình bày được nguyên lý phản ứng RPR, TPHA.
2. Thực hiện được phản ứng RPR, TPHA.
3. Nhận định được kết quả phản ứng RPR, TPHA.

### 1. Đại cương

Bệnh giang mai là bệnh nhiễm khuẩn kinh diễm do xoắn khuẩn *Treponema pallidum* gây ra, tiến triển qua 3 giai đoạn với triệu chứng lâm sàng: sảng, đào ban, mảng niêm mạc, sẩn, cù gôm..., giữa các thời kỳ không có triệu chứng lâm sàng gọi là giang mai kín.

Chẩn đoán bệnh giang mai dựa vào: tiền sử quan hệ tình dục, triệu chứng lâm sàng và kết quả xét nghiệm. Thực tế, nhiều bệnh nhân không có biểu hiện lâm sàng, tiền sử không rõ ràng, vì vậy kết quả xét nghiệm là yếu tố quyết định chẩn đoán.

### 2. Xét nghiệm chẩn đoán giang mai trong phòng thí nghiệm

#### 2.1. Chẩn đoán trực tiếp

Xét nghiệm tìm xoắn khuẩn giang mai tại tổn thương. Đây là xét nghiệm có tính đặc hiệu cao đòi hỏi người xét nghiệm có kinh nghiệm, có kính hiển vi nền đen, hoặc có phương pháp nhuộm riêng (nhuộm Fontana-Tribondeau) nên phương pháp này khó thực hiện ở tuyến dưới và không phải giai đoạn giang mai nào cũng tìm được xoắn khuẩn, vì vậy chẩn đoán bệnh giang mai chủ yếu dựa vào các phản ứng huyết thanh.

Cho đến nay vẫn chưa nuôi cấy được xoắn khuẩn giang mai trên môi trường nhân tạo việc giữ chủng được thực hiện bằng cách cấy chuyên liên tục trong tinh hoàn thỏ.

## *2.2. Chẩn đoán gián tiếp*

Các phản ứng huyết thanh phát hiện bệnh giang mai có chung nguyên lý là dùng kháng nguyên để phát hiện kháng thể có trong huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân. Có 2 loại phản ứng huyết thanh:

### *2.2.1. Phản ứng không đặc hiệu*

Kháng nguyên sử dụng là kháng nguyên lipid từ tim bê, bò bình thường. Kháng thể được phát hiện là kháng thể kháng lipid.

Các kỹ thuật

- VDRL, RPR là một cải tiến của VDRL(phản ứng lên bông).
- BW (phản ứng kết hợp bô thể), Citochol.

### *2.2.2. Phản ứng đặc hiệu*

Kháng nguyên là xoắn khuẩn giang mai, kháng thể được phát hiện là kháng thể kháng xoắn khuẩn giang mai.

Các kỹ thuật:

- Phản ứng bất động xoắn khuẩn giang mai (TPI).
- Phản ứng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (FTA).
- Phản ứng ngưng kết hồng cầu thụ động (TPHA).
- Kỹ thuật ELISA, sắc ký miễn dịch.

## **3. Phản ứng RPR (Rapid Plasma Reagins)**

### *3.1. Nguyên lý*

Kháng nguyên Cardiolipin đã gắn than hoạt khi cho tiếp xúc với huyết tương (huyết thanh) bệnh nhân bị giang mai sẽ cho phản ứng dương tính biểu hiện bằng hiện tượng lên bông.

### *3.2. Quy trình thực hiện*

Thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đây xin hướng dẫn theo quy trình của nhà sản xuất stanbio với bộ sinh phẩm RPRquycktest.

#### *3.2.1. Bệnh phẩm*

Huyết thanh hoặc huyết tương (sử dụng chất chống đông bằng EDTA).

Không sử dụng mẫu tách huyết, các mẫu có hàm lượng lipit trong máu cao.

Huyết thanh để nhiệt độ phòng nếu làm trong ngày. Trong vòng 5 ngày ở

nhiệt độ 2<sup>0</sup>-08<sup>0</sup>C.

Huyết tương ổn định ở nhiệt độ 2-8<sup>0</sup>C trong vòng 24 giờ.

### 3.2.2 *Dụng cụ*

- Giá đựng ống máu.
- Ống đựng máu.
- Máy ly tâm.
- Máy lắc tròn.
- Tủ lạnh thường.
- Tủ âm sâu -20<sup>0</sup>C.
- Pipet 50µl - 100 µl.

### 3.2.3. *Sinh phẩm và các thành phần đi kèm bộ sinh phẩm do nhà sản xuất cung cấp*

TT	<i>Thành phần</i>
1.	RPR antigen suspension: kháng nguyên cardiolipin gắn than hoạt
2.	Negative control: chứng âm
3.	RPR reactive control: chứng dương
4.	RPR weakly-reactive control: chứng dương yếu
5.	RPR non-reactive control: chứng âm tính
6.	Kim băng cỡ 20G: để phân phôi kháng nguyên
7.	Lọ nhựa : để phân phôi kháng nguyên
8.	Pipet nhựa: phân phôi mẫu, một giọt tương đương 50µl
9.	Bìa phản ứng: dùng để làm phản ứng
10.	Bảo quản sinh phẩm ở 2-8 <sup>0</sup> C

*Lưu ý:* - Bảo quản kháng nguyên, chứng âm, chứng dương ở nhiệt độ 2-8<sup>0</sup>C. Riêng đối với kháng nguyên phải bảo quản ở lọ thuỷ tinh.  
- Trước khi làm phản ứng: để hóa chất ở nhiệt độ phòng trong khoảng 15-20 phút cho hết lạnh.

### 3.2.4 Các bước làm phản ứng

#### Phản ứng RPR định tính

Bước	Nội dung thực hiện
1.	Để sinh phẩm cân bằng với nhiệt độ phòng trước khi tiến hành phản ứng.
2.	Sử dụng pipet nhựa nhỏ mẫu vào một vòng tròn trên bìa phản ứng, để giọt rơi tự do. Một giọt mẫu tương đương 50 µl huyết thanh chủng dương, chủng âm đồng thời thực hiện.
3.	Sử dụng đầu dẹt của pipet dàn đều mẫu trong giới hạn vòng tròn
4.	Lắc nhẹ lọ kháng nguyên rồi chuyển vào lọ nhựa phân phối kháng nguyên. Gắn kim phẳng vào lọ. <i>Lưu ý: đảm bảo kim đã được gắn chắc vào lọ.</i>
5.	Nhỏ 1 giọt kháng nguyên vào vòng tròn đã có mẫu. <i>Lưu ý: để giọt kháng nguyên rơi tự do.</i> Không khuấy trộn.
6.	Để tắm phản ứng lên máy lắc và lắc ở tốc độ 100 vòng/phút trong 8 phút. <i>Lưu ý: Đậy tắm phản ứng trước khi khởi động máy lắc.</i>
7.	Nhắc tắm bìa phản ứng ra khỏi máy. Láng nhẹ nhàng hỗn hợp phản ứng.
8.	Đọc kết quả trực tiếp ở nơi có đủ ánh sáng.

*Lưu ý: việc xét nghiệm với mẫu chủng âm và chủng dương cũng phải được tiến hành đồng thời để kiểm tra. Các thao tác cũng làm tương tự như trên.*

#### 3.3. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả sau khi lắc xong.
- Đọc bằng mắt thường nơi đủ ánh sáng.

**Phản ứng dương tính:** Có các hạt kết cụm màu đen (hiện tượng lén bông) trên khắp mặt hoặc trung tâm vòng tròn của bìa phản ứng.

**Phản ứng dương tính yếu:** Có ít các hạt kết cụm màu đen bao quanh rìa vòng tròn bìa phản ứng.

**Kết quả âm tính:** đậm than hoạt tập trung ở giữa vòng tròn, màu xám đồng nhất.

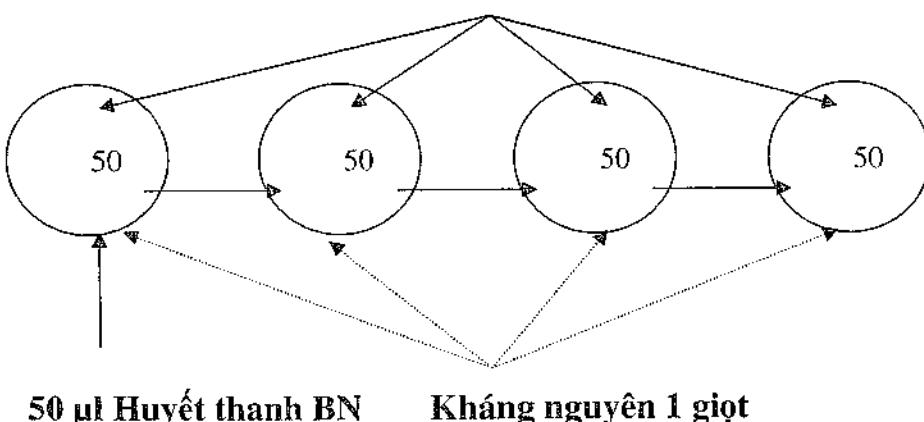
#### Lưu ý:

- Kết quả dương tính, nên làm phản ứng RPR định lượng.
- Làm thêm xét nghiệm bằng một kỹ thuật khác để khẳng định.

**Phản ứng RPR định lượng:** thực hiện phản ứng bằng huyết thanh được pha loãng dần tới độ pha loãng lớn nhất còn cho kết quả dương tính. Pha loãng huyết thanh tiến hành với lượng gấp đôi: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16...

Bước	Nội dung thực hiện
1.	Để sinh phẩm ở nhiệt độ phòng trước khi làm phản ứng.
2.	Nhỏ 50 µl NaCL 0,9% vào vòng tròn trên bìa phản ứng từ số 2-5.
3.	Nhỏ 50 µl mẫu vào vòng tròn 1 và 2.
4.	Pha loãng bậc hai bằng cách trộn đều từ 6-8 lần hỗn hợp ở vòng tròn 2 rồi chuyển 50µl hỗn hợp sang vòng tròn 3 và thực hiện tương tự cho tới vòng tròn 5. Ở vòng tròn 5 sau khi trộn xong loại bỏ 50µl hỗn hợp phản ứng.
5.	Sử dụng đầu dẹt của pipet mới, dàn đều mẫu trong giới hạn vòng tròn. Lưu ý: đi từ vòng tròn có độ pha loãng cao nhất (vòng số 5) sau đó tiếp tục đến vòng 4,3,2,1.
6.	Nhỏ 1 giọt kháng nguyên vào vòng tròn đã có mẫu. <b>Lưu ý:</b> <i>lắc nhẹ nhàng lọ phân phổi kháng nguyên trước khi sử dụng</i> <i>Đáy bảo kim đã được gắn chắc vào lọ phân phổi kháng nguyên</i> <i>Để giọt kháng nguyên rơi tự do. Không khuấy trộn.</i>
7.	Để tấm phản ứng lên máy lắc và lắc ở tốc độ 100 vòng/phút trong 8 phút. <b>Lưu ý:</b> <i>đậy tấm phản ứng trước khi khởi động máy lắc.</i>
8.	Nhắc tấm bìa phản ứng ra khỏi máy. Láng nhẹ nhàng hỗn hợp phản ứng.
9.	Đọc kết quả trực tiếp ở nơi có đủ ánh sáng.

NaCl 9%



### Nhận định kết quả RPR định lượng

Hiệu giá	Vòng tròn 1 1:1	Vòng tròn 2 1:2	Vòng tròn 3 1:4	Vòng tròn 4 1:8	Vòng tròn 5 1:16
1:2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
1:4	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
1:8	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
1:16	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

### 3.4. Ưu điểm và nhược điểm

#### Ưu điểm:

- Đơn giản dễ thực hiện.
- Sàng lọc phát hiện giang mai.
- Độ nhạy, độ đặc hiệu ngang với VDRL và BW.
- Phản ứng định tính và định lượng dùng để theo dõi kết quả điều trị.

#### Nhược điểm:

- Phản ứng có thể dương tính giả trong một số bệnh: lupus ban đỏ, bệnh sốt rét, bệnh phong, bệnh tăng tế bào đơn nhân nhiễm trùng, phụ nữ có thai... những trường hợp này cần làm thêm phản ứng TPHA để xác định chẩn đoán.
- Phản ứng âm tính giả: thường xảy ra trong giai đoạn sớm của bệnh hoặc giai đoạn muộn hoặc giang mai kín.

## 4. Phản ứng TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination Asssay – Phản ứng ngưng kết hồng cầu với kháng nguyên xoắn khuẩn giang mai)

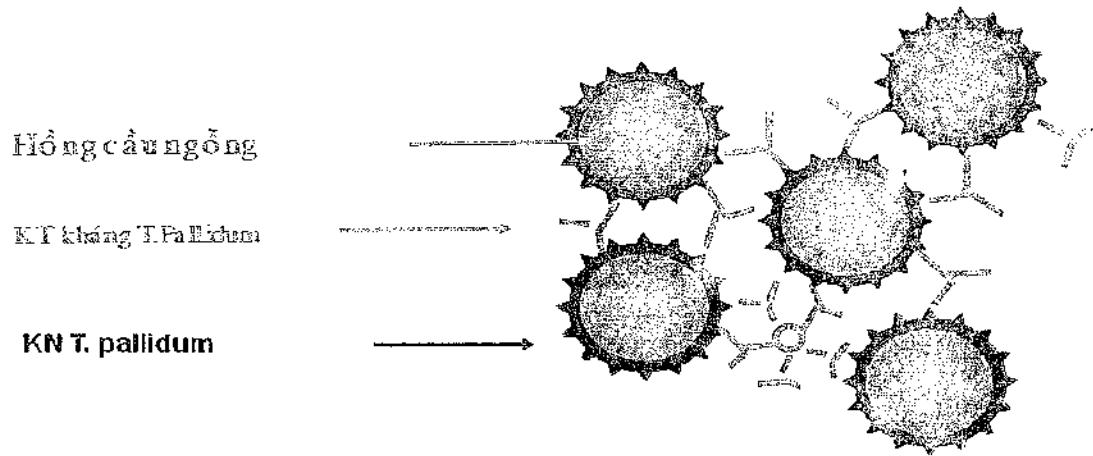
Phản ứng TPHA do Tara Rathlev đề xuất năm 1965. Kháng nguyên được sử dụng là xoắn khuẩn giang mai đã được đánh tois bằng siêu âm rồi gắn lên bề mặt tế bào là hồng cầu cừu, hồng cầu gà, hồng cầu chim..., kháng thể phát hiện là kháng thể kháng xoắn khuẩn.

### 4.1. Nguyên lý

Tế bào đã được gắn kháng nguyên xoắn khuẩn giang mai, khi cho tiếp xúc huyết thanh của bệnh nhân giang mai sẽ bị ngưng kết.

### 4.2. Quy trình thực hiện

Thực hiện quy trình theo hướng dẫn của nhà sản xuất (VD bộ sinh phẩm của Biorad).



**Hình 30.** Nguyên lý phản ứng TPHA

4.2.1. *Bệnh phẩm:* Huyết thanh hoặc huyết tương.

4.2.2. *Dụng cụ*

- Pipet vi lượng các loại: 5 – 10  $\mu\text{l}$ , 25  $\mu\text{l}$ , 75  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ .
- Đầu côn 10 – 200  $\mu\text{l}$ .
- Tâm nhựa có giếng vi lượng 96 giếng đáy tròn làm phản ứng.
- Máy lắc tròn tốc độ 100 vòng/ phút (nếu có).
- Máy li tâm 2000 – 3000 vòng/phút.
- Tủ lạnh.

4.2.3. *Sinh phẩm:* Bộ sinh phẩm TPHA new M của BIO-Rad(VD)

- Hoá chất sinh phẩm được bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C.
- Trước khi làm phản ứng để sinh phẩm ở nhiệt độ phòng tới khi hết lạnh khoảng 15-20 phút.
- Lắc nhẹ nhàng khi dùng để tránh làm biến dạng tế bào.

<i>Tên sinh phẩm</i>	<i>Thành phần</i>
Test cell	Hồng cầu gà được gắn T.palidum
Control cell	Hồng cầu gà không gắn T.palidum
Diluent	Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
Positive control serum	Chứng dương đã được pha loãng trước 1: 20. Có hiệu giá tương đương 1/640 :2560
Non-reacted control serum	Chứng âm. Đã được pha loãng trước ở 1:20

#### 4.2.4. Các bước thực hiện

##### 4.2.4.1. Phản ứng TPHA định tính

Bước	Nội dung thực hiện
<b>Để sinh phẩm ở nhiệt độ phòng 15-20 phút</b>	
1. Pha loãng huyết thanh 1/20	+ Lần lượt nhỏ vào giếng số 1: ✓ 190 µl dung dịch pha loãng huyết thanh. ✓ Nhỏ 10 µl huyết thanh vào trộn đều. (Lúc này huyết thanh ở giếng số 1 có độ pha loãng là 1/20).
2.	Lấy mỗi 25 µl huyết thanh pha loãng 1/20 ở giếng số một nhỏ vào giếng thứ 2 và thứ 3.
3.	Nhỏ 75 µl control cell (dung dịch tế bào không gắn kháng nguyên) vào giếng 2 (độ pha loãng của huyết thanh là 1/80).
4.	Nhỏ 75 µl test cell (dung dịch tế bào gắn kháng nguyên) vào giếng 3 (độ pha loãng của huyết thanh là 1/80).
5.	Trộn đều và lắc nhẹ bằng cách gõ vào thành cầu phiến nhựa hoặc để máy rung ở tốc độ... trong 5 phút.
6.	Đậy khay nhựa và để nhiệt độ phòng từ 45-60 phút.
7.	Nhận định kết quả sau 45 – 60 phút.

Lưu ý: việc xét nghiệm với mẫu chứng âm và chứng dương cũng phải được tiến hành để kiểm tra. Các thao tác cũng làm tương tự như trên.

##### 4.2.4.2 Phản ứng TPHA định lượng

- Huyết thanh bệnh nhân được pha loãng theo tỷ lệ 1/20, 1/40, 1/80, 1/160...

Bước	Nội dung thực hiện
1.	Pha loãng huyết thanh 1/20 (như phần định tính).
2.	Nhỏ 25 µl huyết thanh pha loãng 1/20 nhỏ vào giếng 2 và 3.
3.	Nhỏ 25 µl dung dịch pha loãng huyết thanh vào mỗi giếng từ thứ 4 trở đi.
4.	Nhỏ 25 µl huyết thanh pha loãng 1/20 nhỏ vào giếng thứ 4 trộn đều, chuyển 25 µl huyết thanh pha loãng sang giếng sau, tiếp tục như vậy tới độ pha loãng cần thiết.
5.	Nhỏ 75 µl dung dịch control cell vào giếng 2.
6.	Nhỏ 75 µl test cell vào các giếng tiếp theo.
7.	Trộn đều lắc nhẹ, để ở nhiệt độ phòng.
8.	Nhận định kết quả sau 45 phút.

### Sơ đồ diễn giải phản ứng TPHA

	1	2	3	4	5	6
Dung dịch pha loãng huyết thanh	190µl			25 µl	25 µl	25 µl
Huyết thanh bệnh nhân	10 µl					
Huyết thanh bệnh nhân pha loãng 1/20		25 µl				
Dung dịch hồng cầu không gắn KN (µl)		75µl				
Dung dịch hồng cầu gắn KN (µl)			75µl	75µl	75µl	75µl
Số pha loãng cuối cùng	1: 20	1:80	1: 80	1:160	1:320	1:640

#### 4.2.5. Tính hợp lệ của phản ứng và nhận định kết quả

##### Tính hợp lệ của phản ứng

- Giếng hai chứa mẫu bệnh phẩm với dung dịch tế bào không gắn kháng nguyên (control cell) phải âm tính: tế bào lắng xuống đáy giếng thành một nút nhỏ (nồng độ pha loãng 1:80).
- Mẫu xét nghiệm chứng dương phải dương tính.
- Mẫu xét nghiệm chứng âm phải âm tính.

#### 4.2.6. Đọc và nhận định kết quả

Đặt nhẹ nhàng phiến nhựa lên mặt phẳng, đọc với nguồn ánh sáng trực tiếp. So sánh hình thái ngưng kết của các mẫu thử với mẫu chứng âm tính và chứng dương tính, nhận định kết quả theo bảng dưới đây.

- Nếu mẫu cho kết quả không xác định cần làm lại xét nghiệm và đọc lại kết quả, nếu vẫn cho kết quả không xác định thì cần làm thêm xét nghiệm khác hoặc hẹn bệnh nhân sau 10-14 ngày đến lấy máu kiểm tra lại xem có tăng hiệu giá kháng thể hay không

- Các kết quả dương tính từ hiệu giá 1/80 mới biểu hiện sự có mặt của kháng thể giang mai. Các mẫu huyết thanh dương tính phải tiếp tục làm phản

ứng định lượng.

- Trường hợp phản ứng không đặc hiệu xảy ra cần phải tiến hành làm phản ứng hấp phụ để loại bỏ các thành phần không đặc hiệu.

Kết quả	Test cell	Control cell
Dương tính mạnh	Tế bào ngưng kết dàn mỏng toàn bộ đáy giếng.	Tế bào lồng tạo thành nút nhỏ ở đáy giếng.
Dương tính yếu	Tế bào ngưng kết dàn mỏng 1/3 đáy giếng.	Tế bào lồng tạo thành nút nhỏ ở đáy giếng.
Âm tính	Tế bào lồng xuống tạo thành một nút nhỏ ở đáy giếng.	Tế bào lồng tạo thành nút nhỏ ở đáy giếng.
Không xác định*	Tế bào lồng xuống giống hình một cái nhẫn có viền đều xung quanh.	Tế bào lồng tạo thành nút nhỏ ở đáy giếng.
Phản ứng không đặc hiệu	Phản ứng dương tính.	Phản ứng dương tính.

#### Quy trình thao tác hấp phụ

- Nếu một mẫu ngưng kết với cả giếng có tế bào không gắn kháng nguyên (control cell) và giếng có tế bào gắn kháng nguyên (test cell) thì cần phải làm lại mẫu này với thao tác hấp phụ sau đây:

- + Nhỏ 100 $\mu$ l mẫu bệnh phẩm vào ống nghiệm.
- + Nhỏ tiếp 400 $\mu$ l control cell.
- + Đóng nắp phản ứng bằng cách trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.
- + Ly tâm ở 1000 vòng  $\times$ 15 phút.
- + Dùng pipet hút nước nổi ở bề mặt (độ pha loãng mẫu là 1:5) để làm phản ứng. Cần phải tính toán lại khi pha loãng mẫu.

- Nếu kết quả vẫn xảy ra hiện tượng ngưng kết không đặc hiệu nên thay thế bằng xét nghiệm khác.

#### 4.2.7. Ưu điểm và ứng dụng của phản ứng TPHA

##### Ưu điểm:

- Độ nhạy và độ đặc hiệu cao.
- Phát hiện những trường hợp giang mai không có phản ứng với các kháng

nguyên không đặc hiệu.

- Xác định lại kết quả dương tính của các phản ứng không đặc hiệu.
- Độ nhạy và độ đặc hiệu ngang với FTA.
- Nhận định kết quả dễ dàng bằng mắt thường.
- Có thể thực hiện ở mọi tuyến cơ sở.

### **Nhược điểm**

- Không lưu trữ được kết quả.
- Không phân biệt được nhiễm giang mai hiện tại hay quá khứ.

Bài 31

## CHẨN ĐOÁN DENGUE XUẤT HUYẾT BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ MIỄN DỊCH

### Mục tiêu

1. *Trình bày được thời điểm lấy mẫu thích hợp cho từng loại xét nghiệm phát hiện kháng thể IgG, IgM và kháng nguyên NS1.*
2. *Trình bày được nguyên lý và thực hiện thành thạo kỹ thuật chẩn đoán nhanh sốt xuất huyết bằng bộ sinh phẩm SD Dengue IgM/IgG & Dengue NS1Ag Strip.*
3. *Nhận định được kết quả sau khi làm xét nghiệm.*

### 1. Đại cương

Bệnh sốt Dengue và sốt xuất huyết Dengue (SD/SXHD) là một trong 10 bệnh có tỷ lệ mắc và tử vong cao nhất, số mắc đứng thứ 5, tử vong đứng thứ nhì trong 26 bệnh truyền nhiễm gây dịch. Bệnh SD/SXHD có khả năng lan truyền rộng rãi và gây thành dịch. Dịch có tính chất chu kỳ, thường 3 - 4 năm xảy ra một lần. Bệnh do virus Dengue thuộc họ Flaviviridae, giống Flavivirus gây ra.

### 2 Tính chất kháng nguyên

Protein E: là một glycoprotein tương ứng với kháng nguyên đặc hiệu riêng của từng typ virus Dengue

Protein màng: là một polypeptid tương ứng với kháng nguyên chung của virus Dengue.

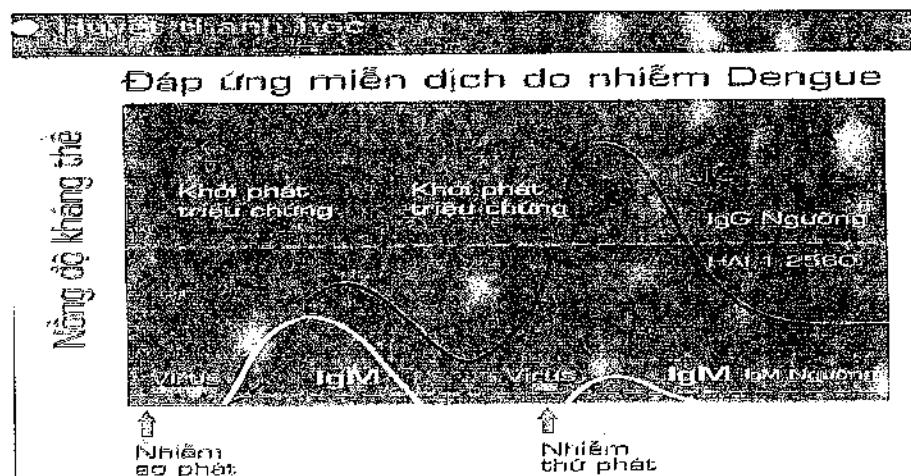
Protein lõi C: là kháng nguyên đặc trưng cho toàn bộ các virus thuộc nhóm Flavivirus. Trong đó có NS1 là kháng nguyên không cấu trúc nằm ở vùng lõi C của virus, xuất hiện ngày thứ nhất của bệnh sau khi khởi sốt và giảm xuống dưới mức phát hiện sau ngày thứ 5-6 của bệnh.

Virus Dengue còn có kháng nguyên kết hợp bô thể, kháng nguyên trung hoà và kháng nguyên ngăn ngưng kết hồng cầu. Dựa vào sự khác biệt giữa các điểm quyết định kháng nguyên, người ta chia virus Dengue làm 4 typ

khác nhau, được ký hiệu là: D1, D2, D3 và D4. Tuy nhiên các typ virus Dengue cũng có một số quyết định kháng nguyên chung, nhất là các kháng nguyên ngăn ngưng kết hồng cầu, nên chúng có hiện tượng ngưng kết chéo giữa các typ.

### 3 Đáp ứng miễn dịch của cơ thể

Đáp ứng miễn dịch tiên phát ở những người chưa bao giờ bị nhiễm flavivirus hoặc những người chưa bao giờ dùng vaccine chống flavivirus: khoảng 3 - 5 ngày sau khi sốt thì người ta có thể phát hiện được kháng thể IgM kháng Dengue. IgM tăng nhanh và đạt mức cao nhất 2 tuần sau khi sốt. Sau khoảng 2 - 3 tháng thì IgM giảm tới mức không thể phát hiện được. Kháng thể IgG xuất hiện sau kháng thể IgM một thời gian ngắn và ở mức thấp hơn.



**Hình 31. Đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với virus Dengue**  
([www.institutpasteur.nc](http://www.institutpasteur.nc))

Đáp ứng miễn dịch thứ phát gặp ở những người đã từng bị nhiễm hoặc đã được chủng ngừa bằng vaccine kháng flavivirus. Đáp ứng miễn dịch thứ phát được đặc trưng bởi sự chiếm ưu thế của IgG, một lượng nhỏ kháng thể IgM được sản sinh ra sau hoặc đồng thời cùng với kháng thể IgG. Trong đáp ứng miễn dịch thứ phát, nồng độ kháng thể IgM thấp hơn trong đáp ứng miễn dịch tiên phát, thậm chí không xuất hiện. Một khi đã phát hiện được thì kháng thể IgG tăng nhanh chóng, đạt tới mức tối đa vào khoảng 2 tuần sau khi khởi

bệnh và sau đó giảm dần sau khoảng 3 - 6 tháng. Những kháng thể được tạo ra trong nhiễm trùng tiên phát có tác dụng miễn nhiễm suốt đời đối với typ virus Dengue gây bệnh.

#### 4. Kỹ thuật sắc ký miễn dịch trong chẩn đoán Dengue xuất huyết

##### 4.1. Kỹ thuật sắc ký miễn dịch phát hiện kháng thể IgM & IgG

*4.1.1. Mục đích:* phát hiện kháng thể IgM và IgG kháng virus Dengue.

*4.1.2. Nguyên lý:* kháng thể IgM đặc hiệu hoặc IgG kháng virus Dengue có trong máu huyết thanh của bệnh nhân sẽ gắn với kháng thể kháng IgM hoặc IgG người được cố định ở hai vạch ngang trên màng của tấm nhựa. Phức hợp keo vàng có chứa kháng nguyên tái tổ hợp của virus Dengue typ 1, 2, 3, 4 sẽ gắn với kháng thể IgM hoặc IgG kháng Dengue của bệnh nhân tạo nên vạch màu hồng có thể nhìn thấy được bằng mắt thường. Sự xuất hiện của vạch chứng chỉ ra rằng thử nghiệm có giá trị để nhận định kết quả.

*4.1.3. Bệnh phẩm:* huyết thanh/huyết tương lấy ở ngày thứ 3 - 7 của bệnh.

Lưu ý: nếu mẫu máu sau khi lấy mà chưa xét nghiệm ngay, phải ly tâm chắt huyết thanh/ huyết tương trong vòng 2 giờ sau khi lấy mẫu và bảo quản mẫu huyết thanh/huyết tương ở nhiệt độ 2-8°C. Trường hợp cần giữ lâu hơn hai tuần, phải bảo quản mẫu ở -20°C.

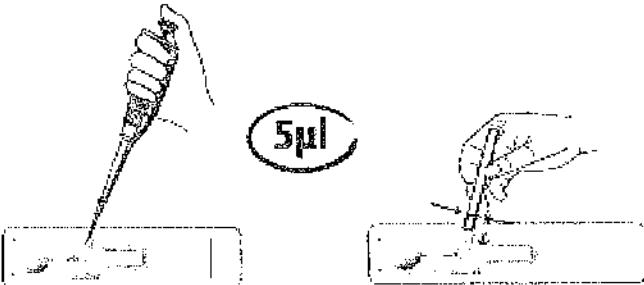
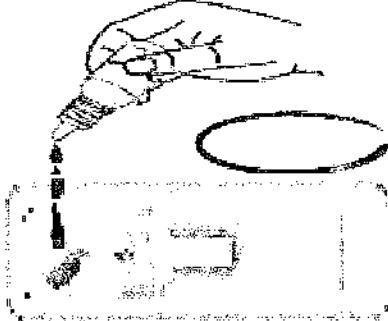
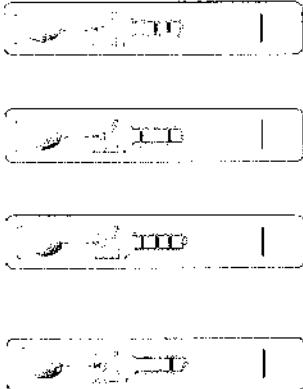
Các mẫu huyết thanh huyết tương bị két túa cần phải làm sạch trước khi thực hiện phản ứng.

Không sử dụng những mẫu bị tán huyết.

#### Bộ sinh phẩm chẩn đoán SD Dengue IgM/IgG

<i>TT</i>	<i>Thành phần</i>
1.	Thanh xét nghiệm: ✓ Cộng hợp kháng nguyên của virus Dengue tái tổ hợp. ✓ Vạch thử G: kháng thể đơn dòng chuột kháng IgG người. ✓ Vạch thử M: kháng thể đơn dòng chuột kháng IgM người. ✓ Vạch chứng: IgG thỏ kháng Dengue.
2.	Dung môi.
3.	Pipet mao dẫn.

### QUY TRÌNH

Bước	Nội dung
1.	Để sinh phẩm ổn định ở nhiệt độ phòng.
2.	Lấy thanh xét nghiệm ra khỏi túi đựng và đặt lên mặt bìa mặt khô, phẳng.
3.	Nhỏ $5\mu\text{l}$ mẫu vào giếng vuông ký hiệu chữ S
	
4.	Nhỏ 3-4 giọt dung môi vào giếng tròn
	
5.	Đọc kết quả trong vòng 15-20 phút <i>Lưu ý: Phải làm lại phản ứng nếu quá 20 phút chưa đọc kết quả</i>
	

#### *4.1.4. Vật liệu và trang thiết bị*

- Máy ly tâm.
- Đồng hồ.
- Ống nghiệm vô trùng.
- Hoá chất sinh phẩm.

#### *4.1.5. Quy trình*

*4.1.6. Nhận định kết quả:* việc đánh giá kết quả cần dựa vào kết quả phối hợp của vạch thử nghiệm IgM, IgG và vạch chứng.

**Âm tính:** vạch màu hồng chỉ xuất hiện ở vùng chứng → Không phát hiện được kháng thể IgM và IgG kháng *Dengue*. Kiểm tra lại sau 3 - 4 ngày nếu nghi ngờ có nhiễm virus *Dengue*.

**IgM dương tính:** vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgM và vùng chứng; thử nghiệm dương tính với kháng thể IgM và gợi ý tới một nhiễm trùng *Dengue* tiên phát.

**IgG dương tính:** vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgG và vùng chứng; Kháng thể IgG dương tính và gợi ý tới một nhiễm trùng *Dengue* thứ phát.

**IgG và IgM dương tính:** vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgM, IgG và vùng chứng; kháng thể IgM và IgG dương tính và gợi ý tới một nhiễm trùng *Dengue* tiên phát muộn hoặc nhiễm *Dengue* thứ phát.

**Kết quả không có giá trị:** nếu không thấy vạch màu hồng xuất hiện ở vùng chứng kết quả của thử nghiệm không có giá trị. Nguyên nhân cơ bản có thể do thể tích mẫu không đủ, hoặc thực hiện sai kỹ thuật. Phải làm lại xét nghiệm trên thanh xét nghiệm khác.

#### *4.1.7. Ưu và nhược điểm*

##### **Ưu điểm:**

- Đơn giản, dễ thực hiện.
- Thời gian cho kết quả nhanh.
- Không đòi hỏi trang thiết bị.

##### **Nhược điểm:**

- Dương tính giả do phản ứng chéo trong nhóm flavivirus.
- Âm tính giả do lấy mẫu sớm kháng thể chưa kyp hình thành.

*Lưu ý: các mẫu có lượng lipid cao hoặc có các yếu tố dạng thấp có thể ảnh hưởng đến kết quả.*

## **4.2. Kỹ thuật sắc ký miễn dịch phát hiện kháng nguyên NS1**

### **4.2.1. Mục đích:**

Phát hiện được kháng nguyên NS1 của virus Dengue trong nhiễm virus Dengue cấp tính.

### **4.2.2. Nguyên lý**

Kháng nguyên NS1 (nếu có) trong huyết thanh/huyết tương sẽ di chuyển dọc theo màng sắc ký tới vùng T để kết hợp với chất cộng hợp gắn keo vàng được phủ bởi kháng thể kháng NS1Ag và những hạt gắn keo vàng được phủ streptavidin tạo thành phức hợp miễn dịch Ab-Ag-Ab gắn vàng màu xanh hoặc tím hồng có thể nhìn thấy được bằng mắt thường. Tại vùng C phải luôn luôn xuất hiện vạch màu xanh hoặc tím hồng để chứng tỏ thanh thử có giá trị.

**4.2.3. Bệnh phẩm:** huyết thanh/huyết tương hoặc máu toàn phần lấy từ ngày thứ 1 - 9 của bệnh.

- Lưu ý:**
- Nếu mẫu máu sau khi lấy mà chưa xét nghiệm ngay, phải ly tâm chất huyết thanh/ huyết tương trong vòng 2 giờ sau khi lấy mẫu và bảo quản mẫu huyết thanh/huyết tương ở nhiệt độ 2-8°C. Trường hợp cần giữ lâu hơn 1 tuần, phải bảo quản mẫu ở -20°C.
  - Không được sử dụng các mẫu huyết thanh/huyết tương bị đông/tan băng quá 3 lần. Các mẫu huyết thanh/huyết tương bị kết tua cần phải làm sạch trước khi thực hiện phản ứng.
  - Không sử dụng những mẫu bị tán huyết.

### **4.2.4. Vật liệu và trang thiết bị**

- Pipet bán tự động dùng để phân phối các thể tích từ 5 - 100 µl.
- Đầu côn 5 - 200 µl.
- Bộ sinh phẩm chẩn đoán Dengue NS1Ag Strip:

1	Thanh phản ứng: cộng hợp kháng thể NS1 có gắn hạt keo vàng được bao phủ bởi streptavidin. Vùng phản ứng (T): gắn kháng thể đơn dòng kháng NS1. Vùng chứng (C): gắn biotin.
2	Dung dịch hỗ trợ di chuyển mẫu bệnh phẩm trên thanh phản ứng.

#### 4.2.5. Quy trình

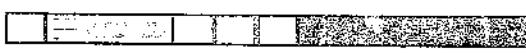
Bước	Nội dung
1.	Nhỏ 50µl mẫu vào ống nghiệm. <u>Lưu ý:</u> ống nghiệm phải có chiều cao >45mm và đường kính <15mm.
2.	Nhỏ 1 giọt dung dịch đệm di chuyển vào ống nghiệm chứa mẫu.
3.	Đóng nắp hồn hợp phản ứng bằng cách lắc nhẹ nhàng ống nghiệm.
4.	Đặt thanh thử theo phương thẳng đứng vào trong ống nghiệm, hướng chiều mũi tên xuống dưới. Kiểm tra để đảm bảo thanh thử đã được nhúng vào dung dịch bệnh phẩm đã pha loãng.
5.	Đọc kết quả sau khi hoàn thành phản ứng 15 phút. <u>Lưu ý:</u> Nếu vạch phản ứng (ở vùng T) yếu hoặc kết quả âm tính thì đặt lại thanh phản ứng vào trong ống nghiệm và đọc lại kết quả sau 15 phút nữa. Phải làm lại phản ứng nếu sau khi hoàn thành phản ứng sau 1 giờ mà vẫn chưa nhận định kết quả.
6.	Bảo quản bộ sinh phẩm nếu còn ở 2 - 8°C.

#### 4.2.6. Diễn giải và đọc kết quả

- Âm tính: Chỉ một đường màu xuất hiện ở vùng Chứng (C).



- Dương tính: hai đường màu xuất hiện ở vùng chứng (C) và vùng T.



- Không có giá trị: không thấy xuất hiện đường màu nào. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.



#### 4.2.7. Ưu nhược điểm

##### Ưu điểm

- Kỹ thuật đơn giản, dễ thực hiện.
- Thời gian cho kết quả nhanh: 15 phút.
- Có thể chẩn đoán sớm: ngay từ ngày đầu tiên của bệnh.
- Không đòi hỏi trang thiết bị.

### Nhược điểm

- Dương tính giả: hay gặp ở phụ nữ có thai, viêm khớp dạng thấp, bệnh tự miễn.
- Âm tính giả: do lấy mẫu quá sớm.
- Không phân biệt được Dengue nguyên phát và Dengue thứ phát.

Bài 32

## CHẨN ĐOÁN ROTAVIRUS NHÓM A BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ MIỄN DỊCH

### Mục tiêu

1. Trình bày được nguyên lý và thực hiện thành thạo các bước của kỹ thuật sắc ký miễn dịch chẩn đoán Rotavirus
2. Nhận định được kết quả sau khi làm xét nghiệm.

### 1. Đại cương

Rotavirus là căn nguyên chính của bệnh viêm dạ dày - ruột cấp tính gây tiêu chảy ở trẻ nhỏ và động vật. Bệnh rất thường gặp ở trẻ em và trẻ nhỏ, đặc biệt là lứa tuổi từ 3 tháng đến 2 tuổi. Bệnh cũng có thể xảy ra ở người lớn và thường nhẹ hơn.

Rotavirus (thuộc họ Reoviridae) được chia làm 7 nhóm: A, B, C, D, E, F và G trong đó chỉ có nhóm A,B,C gây bệnh cho cả người và động vật. Nhóm D, E, F, G chỉ thấy ở động vật. Nhóm A hay gặp nhất gây ra các vụ dịch tiêu chảy ở trẻ em..

Tiêu chảy cấp do Rotavirus lây lan rất nhanh, chủ yếu qua con đường phân - miệng và tay - miệng, ngoài ra còn có thể lây theo đường hô hấp. Thời gian ủ bệnh dưới 4 ngày, virus đào thải ra ngoài theo phân trước khi có biểu hiện tiêu chảy hoặc sau các đợt tiêu chảy điều này cho thấy khả năng lây nhiễm tiềm ẩn rất cao.

Virus được thải ra ngoài theo phân của người bệnh với nồng độ tối đa ngay khi triệu chứng bệnh bắt đầu xuất hiện và giảm dần cho đến ngày thứ 9-10. Virus tồn tại rất lâu trong phân, ở bàn tay, trên sàn nhà, các đồ vật... bị nhiễm. Trẻ dễ dàng bị nhiễm bệnh do uống hoặc ăn phải thức ăn bị nhiễm bẩn do sờ chạm vào các bề mặt, các đồ vật (bàn ghế, đồ chơi, sàn nhà...) bị nhiễm bẩn.

#### *Chẩn đoán phòng thí nghiệm*

Có rất nhiều kỹ thuật để phát hiện trực tiếp Rotavirus hoặc phát hiện kháng thể kháng Rotavirus trong phòng xét nghiệm. Tuy nhiên, bệnh tiêu

chảy cấp do Rotavirus là một bệnh cấp tính, đòi hỏi phải chẩn đoán sớm và điều trị kịp thời nên phương pháp phát hiện trực tiếp virus gây bệnh từ bệnh phẩm là có giá trị nhất. Có rất nhiều kỹ thuật để chẩn đoán Rotavirus trong đó kỹ thuật sắc ký miễn dịch là một trong những kỹ thuật rất thông dụng được thực hiện tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

## 2. Kỹ thuật sắc ký miễn dịch

**2.1. Mục đích:** phát hiện định tính Rotavirus nhóm A trong bệnh phẩm phân của người.

### 2.2. Nguyên lý

Kháng nguyên của Rotavirus nhóm A sẽ di chuyển dọc theo màng nitrocelulose tới vùng phản ứng để kết hợp với cộng hợp gắn keo vàng được phủ bởi kháng thể đơn dòng của chuột kháng Rotavirus, sau đó tiếp tục gắn đặc hiệu với kháng thể đơn dòng của thỏ kháng Rotavirus được gắn trên màng tạo thành phức hợp miễn dịch Ab-Ag-Ab gắn keo vàng có màu tím hồng có thể nhìn thấy được bằng mắt thường. Tại vùng chứng phải luôn luôn xuất hiện vạch màu tím hồng để chứng tỏ thanh thử có giá trị.

### 2.3. Bệnh phẩm

Phân của bệnh nhân bị tiêu chảy vào lọ vô trùng ngay từ tuần đầu tiên của bệnh.

### 2.4. Vật liệu và trang thiết bị

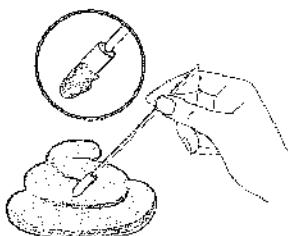
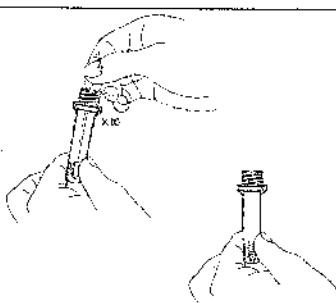
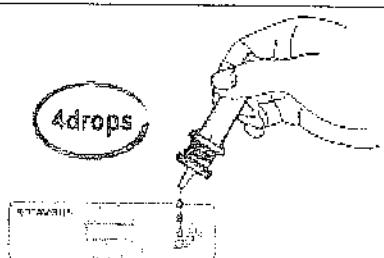
- Que tăm bông lấy bệnh phẩm.
- Ống nghiệm (được cung cấp sẵn trong bộ kít).
- Nước muối sinh lý.

### 2.5. Sinh phẩm

Bộ sinh phẩm chẩn đoán SD Bioline Rotavirus

1.	Thanh thử phản ứng
2.	Dung dịch pha loãng mẫu
3.	Ống nghiệm đựng mẫu bệnh phẩm
4.	Ống nhỏ giọt dùng một lần
5.	Que tăm bông

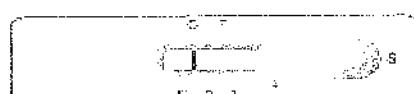
## 2.6. Quy trình

Bước	Nội dung thực hiện
1.	Bỏ sô test cần làm ra ngoài để ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi làm.
2.	Lấy thanh xét nghiệm ra khỏi túi đựng và đặt lên mặt bê mặt khô, phẳng.
3.	Sử dụng ống hút cung cấp trong bộ kít hút dung dịch pha loãng bệnh phẩm lên tới vạch đã đánh dấu và chuyển vào trong ống nghiệm.
4.	Lấy khoảng 50 mg phân bìng que tăm bông vô trùng nhúng vào ống nghiệm có chứa dung dịch pha loãng. 
5.	Xoay tròn que tăm bông ít nhất 10 lần cho tới khi bệnh phẩm đã hoà vào dung dịch pha loãng thì rút que tăm bông ra, vừa rút vừa ép que tăm bông vào thành trong của ống nghiệm để đảm bảo lấy được hết bệnh phẩm. 
6.	Đậy nắp ống nghiệm đã có bệnh phẩm lại. 
7.	Nhỏ 4- 5 giọt vào giếng nhỏ bệnh phẩm (có chữ S). Đọc kết quả sau 10-20 phút. Quá 20 phút, kết quả không có giá trị. 

## 2.7. Diễn giải và đọc kết quả

- Âm tính: chỉ 1 môt đường màu xuất hiện ở vùng chứng C.
- Dương tính: 2 đường màu xuất hiện ở vùng chứng (C) và vùng thử nghiệm (T).
- Không có giá trị: không thấy xuất hiện đường màu nào hoặc chỉ có một

đường màu tại vùng thử nghiệm (T). Khi đó phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.



**Hình 32. Đọc kết quả test SD Bioline Rotavirus**

### **2.8. Ưu nhược điểm**

#### **Ưu điểm**

- Đơn giản, dễ thực hiện.
- Không đòi hỏi trang thiết bị.
- Thời gian cho kết quả nhanh: 10-20 phút.

#### **Nhược điểm**

- Không lưu trữ được kết quả.
- Âm tính giả: Lượng virus đào thải ra ngoài quá thấp, hoặc do sai sót trong quá trình lấy và xử lý mẫu.
- Không chẩn đoán phân biệt được các nhóm Rotavirus khác nhau.

## Bài 33

# CHẨN ĐOÁN THƯƠNG HÀN BẰNG PHẢN ỨNG WIDAL

### Mục tiêu

1. Trình bày được nguyên lý của phản ứng Widal chẩn đoán thương hàn.
2. Thực hiện được các bước của phản ứng Widal theo đúng quy trình.
3. Nhận định được kết quả của phản ứng Widal.

### 1. Đại cương

Thương hàn là bệnh nặng, truyền nhiễm và gây thành dịch. Bệnh thương hàn do *Salmonella* như *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C* gây ra.

*Salmonella* có 3 nhóm kháng nguyên: O, H và K.

Kháng nguyên O: Là kháng nguyên thân gồm gần 70 yếu tố khác nhau.

Kháng nguyên H: Là kháng nguyên lông của *Salmonella*, có tính đặc hiệu đơn hoặc kép. Hầu hết *Salmonella* có kháng nguyên H.

Kháng nguyên K (Vi): Là kháng nguyên bề mặt của vi khuẩn. Kháng nguyên này chỉ có ở *S. typhi* và *S. paratyphi C*. Kháng nguyên Vi có thể bao phủ kín kháng nguyên O.

Sau khi mắc bệnh thương hàn, trong huyết thanh bệnh nhân có các kháng thể chống lại các kháng nguyên O, H (và cả kháng nguyên Vi đối với những trường hợp do *S. typhi* và *S. paratyphi*). Năm 1896, Widal chứng minh rằng huyết thanh của bệnh nhân thương hàn có khả năng làm ngưng kết *S. typhi*. Đây là cơ sở cho việc áp dụng chẩn đoán huyết thanh học.

### 2. Chẩn đoán gián tiếp bệnh thương hàn bằng phản ứng Widal

Khi nhiễm *Salmonella*, trong máu sẽ xuất hiện kháng thể O sau 7-10 ngày và kháng thể H sau 12-14 ngày. Thời gian tồn tại kháng thể trong máu trung bình là 3 tháng đối với kháng thể O và 1-2 năm đối với kháng thể H.

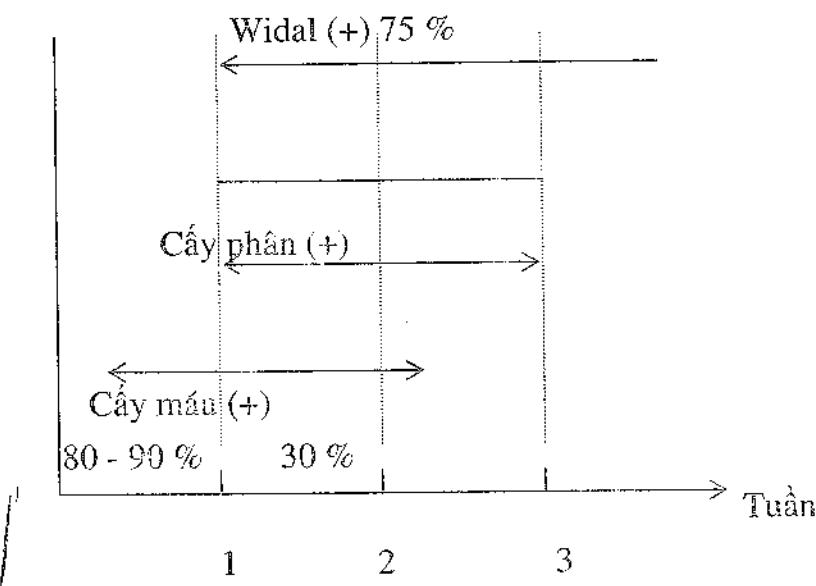
#### 2.1. Nguyên lý

Phản ứng Widal là phản ứng ngưng kết phát hiện kháng thể O và kháng

thể H có trong huyết thanh bệnh nhân. Kháng nguyên O và H của vi khuẩn *Salmonella* khi gặp kháng thể tương ứng có trong huyết thanh bệnh nhân sẽ có sự ngưng kết đặc hiệu tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới dạng hạt màu trắng và mắt thường có thể nhìn thấy được.

Trong giai đoạn đầu có thể chỉ thấy kháng thể O. Đến giai đoạn toàn phát sẽ thấy cả kháng thể O và H. Phản ứng Widal cần được làm 2 lần để xác định động lực kháng thể: lần đầu ở tuần thứ nhất và lần hai ở tuần thứ hai của bệnh. Kết quả xét nghiệm Widal lần đầu thường không cho phép kết luận chắc chắn nên việc chẩn đoán phải căn cứ vào động lực kháng thể sau khi có kết quả lần 2.

*Sơ đồ tóm tắt các thời điểm chọn cây máu, cây phân  
huyết thanh chẩn đoán (Widal)*



## 2.2. Kỹ thuật xét nghiệm

Áp dụng kỹ thuật ly tâm nhanh (Rapid centrifugation technique)

### 2.2.1. Bệnh phẩm

Lấy 3ml máu vào ống không chống đông để máu đông tự nhiên và ly tâm ở  $1000v \times 10$  phút để lấy huyết thanh.

*Lưu ý: nếu mẫu huyết thanh chưa làm ngay trong 24 giờ phải bảo quản mẫu ở nhiệt độ  $2-8^{\circ}C$  hoặc tủ âm sâu  $-20^{\circ}C$ . Không sử dụng mẫu máu bị tan huyết. Huyết thanh để làm phản ứng chỉ được phép đông tan bằng một lần và*

khi tan đồng mẫu phải được lắc kỹ trước khi làm phản ứng. Không được xử lý mẫu bằng nhiệt.

#### 2.2.2. Trang thiết bị

- Máy ly tâm.
- Ống nghiệm 12 mm.
- Pipet các loại: 100 µl, 500 µl, 1000 µl.
- Giá cắm ống nghiệm.

#### 2.2.3. Sinh phẩm và hóa chất

Sinh phẩm chẩn đoán thương hàn của hãng Bio-Rad gồm 6 loại kháng nguyên TO, TH, AO, AH, BO, BH là các kháng nguyên thân và kháng nguyên lông của *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*.

Nước muối sinh lý.

TO	Samonella typhy antigen O
TH	Samonella typhi antigen H
AO	Samonella paratyphi antigen O
AH	Samonella paratyphi antigen H
BO	Samonella paratyphi antigen O
BH	Samonella paratyphi antigen H
	Bảo quản sinh phẩm ở 2-8°C

#### 2.3. Các bước tiến hành

#### 2.4. Nhận định kết quả

Gõ nhẹ vào đáy của ống nghiệm và quan sát:

- Phản ứng âm tính: nếu hỗn hợp phản ứng đồng nhất.
- Phản ứng dương tính: các hạt ngưng kết có thể quan sát được bằng mắt thường.
  - + Kháng thể O: ngưng kết hạt nhỏ, bền vững, lắc khó tan.
  - + Kháng thể H: ngưng kết như bông, hạt to, khi lắc dễ tan.
  - + Hiệu giá kháng thể được tính ở ống huyết thanh nào có độ pha loãng lớn nhất vẫn còn hiện tượng ngưng kết xảy ra.

### ***Giải thích kết quả***

- Kháng thể O xuất hiện ở ngày thứ 8 của bệnh và đạt được hiệu giá 1:400 và sau đó kháng thể này sẽ mất rất nhanh sau giai đoạn cấp của bệnh.
- Kháng thể H xuất hiện ở ngày thứ 10-12, và đạt được hiệu giá 1:800 đến 1:1600 rồi giảm dần và tồn tại sau nhiều năm ở hiệu giá 1:100 đến 1:200.
- Trường hợp bệnh nhân được tiêm vac xin thương hàn (TAB), hiệu giá kháng thể O và H thấp, Đôi khi kháng thể H có thể tồn tại ở hiệu giá < 1:200.
- Nếu bệnh nhân bị bệnh thương hàn đã được điều trị bằng kháng sinh, thì kháng thể O có thể không xuất hiện. Việc chẩn đoán phải dựa vào triệu chứng lâm sàng và sự tăng hiệu giá kháng thể H có ý nghĩa trong mẫu máu kép, được lấy cách nhau 7-10 ngày.

### ***2.5. Ưu điểm và nhược điểm của phản ứng***

#### **Ưu điểm**

- Đơn giản, dễ thực hiện.
- Thời gian cho kết quả nhanh.

#### **Nhược điểm**

- Âm tính giả: có thể do lấy máu quá sớm.
- Dương tính giả: gặp ở bệnh nhân nhiễm Rickettsia, một số trường hợp viêm gan mạn tính, nhiễm vi khuẩn Gram (-).
- Phản ứng widal chỉ có giá trị định hướng cho chẩn đoán.
- Có thể xảy ra hiện tượng ngưng kết vùng do đó dễ bỏ sót.
- Sai sót do người làm kỹ thuật.

Các bước tiến hành													
TT	Nội dung thực hiện												
1	Để sinh phẩm ở nhiệt độ phòng 15-20 phút trước khi làm xét nghiệm												
2	Kiểm tra tên, tuổi giữa bệnh phẩm và giấy xét nghiệm Ghi tên và đánh dấu từng ống xét nghiệm												
3	Pha loãng huyết thanh (HT) bệnh nhân: + Pha loãng huyết thanh 1/10: 0,2ml huyết thanh + 1,8 ml NaCl 0,9% + Pha loãng huyết thanh 1/20: 0,1ml huyết thanh + 1,9 ml NaCl 0,9%												
4	Chỗ vào các ống xét nghiệm theo sơ đồ												
	Ống nghiệm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	HT pha loãng 1/20		0,1 ml										
	HT pha loãng 1/100	0,1 ml											
	Kháng nguyên	0,9 ml TO	0,9 ml TO	0,9 ml TH	0,9 ml TH	0,9 ml AO	0,9 ml AO	0,9 ml AH	0,9 ml AH	0,9 ml BO	0,9 ml BO	0,9 ml BH	0,9 ml BH
5	Độ pha loãng cuối cùng	1/10 0	1/20 0										
6	Ly tâm 3000 vòng trong 5 phút												
6	Đọc kết quả bằng mắt thường hoặc kính lúp trên nền màu đen												

**Bài 34**  
**PHÁT HIỆN ANTISTREPTOLYSIN O BẰNG**  
**KỸ THUẬT NGUNG KẾT HẠT LATEX**

**Mục tiêu**

1. *Trình bày được mục đích và nguyên lý của kỹ thuật ngung kết hạt latex để chẩn đoán liên cầu.*
2. *Nêu và thực hiện được quy trình xét nghiệm của kỹ thuật này và nhận định được kết quả của xét nghiệm*

**1. Đại cương**

Streptolysin O: Là một loại dung huyết tố được tìm thấy ở liên cầu gây tan máu  $\beta$  (bêta). Streptolysin O dễ bị mất hoạt tính bởi oxy, vì thế nên nó có khả năng làm tan hồng cầu ở phía sâu môi trường thạch. Streptolysin O mang tính chất của một ngoại độc tố; nó có tính kháng nguyên rất mạnh, do đó kích thích cơ thể sản xuất ra kháng thể Anti Streptolysin O (ASO).

Định lượng kháng thể kháng streptolysin O (ASO) thường dương tính ở những người nhiễm liên cầu. Nó có giá trị chẩn đoán và điều trị dự phòng đặc biệt đối với những bệnh nhân bị thấp tim và viêm cầu thận cấp ở trẻ em. Tỷ lệ dương tính thường đạt từ 70% - 85%. Hiệu giá kháng thể này đạt cao nhất từ tuần thứ 3-5 sau nhiễm liên cầu khuẩn và trở về bình thường sau 2- 4 tháng.

**2. Kỹ thuật ngung kết hạt latex để chẩn đoán liên cầu**

**2.1. Mục đích**

Xác định và bán định lượng nồng độ kháng thể Anti Streptolysin O trong máu của bệnh nhân.

**2.2. Nguyên lý**

Kỹ thuật ngung kết hạt latex được thực hiện dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết thụ động (gián tiếp), kháng nguyên hoà tan được gắn lên trên nền muren hữu hình là hạt latex. Hạt latex được bao phủ bởi kháng nguyên Stepptolysin O khi được trộn với huyết thanh bệnh nhân có chứa kháng thể

Anti Streptolysin O sẽ tạo nên sự ngưng kết mà ta có thể quan sát bằng mắt thường trên một phiến kính nền đèn.

Hoá chất có chứa hạt latex được sản xuất sao cho sự ngưng kết sẽ chỉ xảy ra ở nồng độ kháng thể Anti Streptolysin O  $\geq 200\text{IU/ml}$ .

### 2.3. Quy trình xét nghiệm

2.3.1. Bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương.

2.3.2. Trang thiết bị và vật liệu

- Máy li tâm: dùng để li tâm máu, lấy huyết thanh của bệnh nhân.

- Đồng hồ.

- Pipetman.

- Pipet và que trộn dùng một lần có sẵn trong hộp sinh phẩm

- Ống nghiệm vô trùng.

- Nguồn sáng.

2.3.3. Hoá chất

- Bộ sinh phẩm Rapet ASO gồm:

- ASO latex reagent: Hỗn dịch chứa hạt latex được phủ bởi kháng nguyên Streptolysin O.

- Chứng dương.

- Chứng âm.

- Dung dịch đệm: dùng để pha loãng huyết thanh khi làm kỹ thuật bán định lượng nồng độ Anti Streptolysin O. (Có thể thay bằng nước muối đắt trung 0,9%).

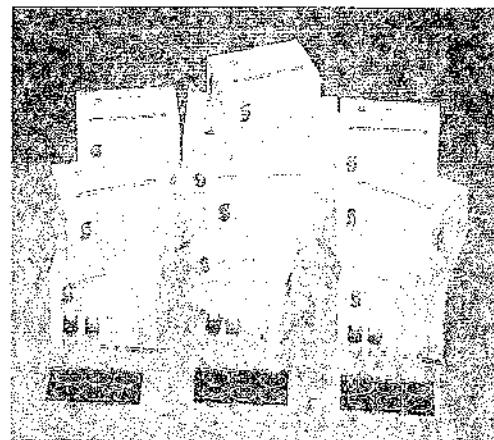
*Lưu ý: khi chưa thực hiện xét nghiệm, hoá chất phải luôn được bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C.*

2.3.4. Các bước tiến hành

2.3.5. Nhận định kết quả

- Ở chứng dương: có hiện tượng ngưng kết hạt latex

- Ở chứng âm: không có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy mịn, đồng nhất.

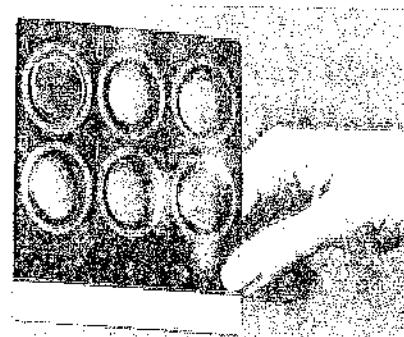


- Ô không có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy mịn, đồng nhất: Âm tính.

- Ô có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy thô, có hạt ngưng kết rõ trên nền đen: Ngưng kết hạt latex với nồng độ Anti Streptolysin O  $\geq 200$  IU/ml.

- Cần làm tiếp kỹ thuật bán định lượng.

#### Xác định nồng độ kháng thể Anti Streptolysin O trong máu



Bước	Kỹ thuật
1.	Bỏ sinh phẩm ra ngoài nhiệt độ phòng 15 phút trước khi làm xét nghiệm.
2.	Đánh số thứ tự các bệnh phẩm cần làm và số thứ tự trên tấm kính.
3.	Lắc nhẹ nhàng lọ chứa hạt latex, không được lắc quá mạnh.
4.	Dùng pipet dùng một lần hút và nhỏ 1 giọt huyết thanh của bệnh nhân vào ô tương ứng đã đánh số trên phiến kính. Hai ô cuối cùng nhỏ chứng dương và chứng âm. <i>* Lưu ý: bệnh phẩm phải tạo cục máu đông hoàn toàn để huyết thanh bệnh nhân không còn sợi fibrin sau ly tâm.</i>
5.	Lắc nhẹ nhàng một lần nữa lọ có chứa hạt latex và nhỏ một giọt vào cạnh huyết thanh của bệnh nhân.
6.	Trộn đều 2 loại với nhau bằng que trộn đã được cung cấp sao cho phủ đều bề mặt của mỗi ô.
7.	Lắc đều cả phiến kính bằng tay sao cho hỗn dịch đã trộn xoay tròn, chậm bên trong ô hoặc dùng máy lắc 80-100 vòng trong 2 phút.
8.	Đọc kết quả.

Pha loãng huyết thanh	ASO (IU/ml) ( $\pm 20\%$ )
1 huyết thanh (HT) + 1 dung dịch đệm (DD) (1:2)	400 IU/ml
1 HT + 2 DD (1:3)	600 IU/ml
1 HT + 3DD (1:4)	800 IU/ml
1 HT + 3DD (1:4)	1000 IU/ml

Bán định lượng nồng độ Anti Streptolysin O trong huyết thanh: cần pha loãng huyết thanh của bệnh nhân và tiếp tục làm phản ứng như ở phần trên:

Ở độ loãng huyết thanh lớn nhất mà còn xảy ra hiện tượng ngưng kết thì đọc nồng độ ASO tương ứng ở đó. Ví dụ: ngưng kết xảy ra ở độ loãng huyết thanh lớn nhất là 1:4 thì nồng độ ASO là 800 IU/ml.

#### 2.4. Ưu điểm của kỹ thuật

- Đơn giản, dễ thực hiện.
- Không đòi hỏi trang thiết bị.
- Có thể thực hiện ở mọi tuyến cơ sở.

#### 2.5. Hạn chế của phản ứng

- Nếu lắc quá thời gian (>2 phút) có thể xảy ra dương tính giả.
- Khi nồng độ ASO > 2000 IU/ml có thể ức chế sự ngưng kết. Trên lâm sàng mà có triệu chứng rõ thì cần pha loãng huyết để làm phản ứng.
- Các mẫu bệnh phẩm tan huyết hoặc mỡ máu cao có thể dẫn tới một kết quả không chính xác.

#### 2.6. Giá trị của chẩn đoán

Mối liên quan giữa viêm họng do liên cầu tan máu bê ta nhóm A và thấp tim đã được biết rõ từ rất lâu. Người ta nhận thấy: có bằng chứng của sự tăng rõ rệt kháng thể kháng streptolysin O trong huyết thanh bệnh nhân bị thấp tim và hiệu quả rõ rệt của kháng sinh trong phòng bệnh thấp tim và giảm mức độ tái phát của bệnh. Kể từ khi xét nghiệm phát hiện anti streptolysin O do Todd đề xuất năm 1932, xét nghiệm này đã được ứng dụng rộng rãi trong các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng và là xét nghiệm hỗ trợ cho các bác sĩ lâm sàng trong chẩn đoán thấp tim. Tuy nhiên, nhiễm liên cầu (ASO dương tính) chỉ là những yếu tố nguy cơ gây thấp tim vì vậy việc chẩn đoán vẫn phải dựa vào các xét nghiệm bổ sung và thăm khám lâm sàng một cách có hệ thống.

Nồng độ ASO ở người bình thường là < 200 IU/ml, nhưng nồng độ này còn thay đổi phụ thuộc vào lứa tuổi và các địa phương khác nhau. Khi nồng độ ASO ≥ 200IU chứng tỏ bệnh nhân vừa mới mắc liên cầu. Tuy nhiên, nếu nồng độ thấp cũng chưa chắc chắn là bệnh nhân không mắc liên cầu. Nếu có nghi ngờ trên lâm sàng, cần làm lại xét nghiệm sau 2 tuần.

Hiệu giá kháng thể ASO tăng dần từ tuần đầu và đạt hiệu giá cao nhất sau 3-5 tuần. Sau 2-4 tháng, ASO có thể trở về bình thường nếu không có tái nhiễm liên cầu.

**Bài 35**  
**CHẨN ĐOÁN CÚM A, B**  
**BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ MIỄN DỊCH**

**Mục tiêu**

1. *Trình bày được nguyên lý và thực hiện thành thạo các bước của kỹ thuật sắc ký miễn dịch chẩn đoán virus cúm.*
2. *Nhận định được kết quả sau khi làm xét nghiệm.*

**1. Đại cương**

Virus cúm gây bệnh cúm cho người và động vật, chúng có thể gây nên những trận đại dịch cúm trên toàn thế giới.

Virus cúm thuộc họ Orthomyxoviridae, gồm 3 typ miễn dịch: A, B, C. Virus cúm typ A, B gây bệnh cho người và nhiều loài động vật (chim, lợn, gà). Virus cúm typ A thường gây đại dịch, virus cúm typ B thường chỉ gây dịch nhỏ hơn, virus cúm typ C chỉ gây nên các triệu chứng giống như bệnh cảm lạnh thông thường.

Các kháng nguyên quan trọng của virus cúm gồm các kháng nguyên đặc hiệu nhóm và các kháng nguyên đặc hiệu typ. Kháng nguyên đặc hiệu typ gồm kháng nguyên nucleoprotein (NP) và protein màng M1. Các kháng nguyên đặc hiệu phân typ gồm hai kháng nguyên quan trọng nhất của virus là kháng nguyên ngưng kết hồng cầu Hemagglutinin (kháng nguyên H) và kháng nguyên có hoạt tính enzym Neuramidase (kháng nguyên N). Hiện nay đã phân biệt được 15 thứ typ kháng nguyên H (ký hiệu H1 - H15) và 9 thứ typ N (ký hiệu N1 - N9). Sự kết hợp giữa H và N sẽ tạo ra rất nhiều thứ typ khác nhau với khả năng gây bệnh không giống nhau. H5 và H7 là loại có độc tính rất cao.

Virus cúm xâm nhập vào cơ thể và gây bệnh bằng đường hô hấp. Thời gian ủ bệnh ngắn, từ 1 - 5 ngày. Virus cúm có thể gây ra một loạt bệnh cảnh lâm sàng từ thể rất nhẹ như viêm nhiễm đường hô hấp trên cho đến thể bệnh rất nặng là viêm phổi gây tử vong. Bệnh cúm có thể gặp ở mọi lứa tuổi nhưng đặc biệt nặng ở trẻ sơ sinh, người già và người mắc bệnh mạn tính. Bệnh dễ

tạo thành dịch lớn hoặc nhỏ và diễn biến dịch nhanh chóng. Sau khi khỏi bệnh, miễn dịch không vững bền.

## 2. Chẩn đoán phòng thí nghiệm

Có rất nhiều kỹ thuật để phát hiện trực tiếp virus cúm hoặc gián tiếp phát hiện kháng thể kháng virus cúm trong phòng xét nghiệm. Tuy nhiên, phương pháp phát hiện trực tiếp virus gây bệnh từ bệnh phẩm là có giá trị nhất. Có rất nhiều kỹ thuật trực tiếp để chẩn đoán virus cúm như phân lập và định danh virus, kỹ thuật PCR phát hiện ARN của virus cúm trong bệnh phẩm, nhưng những kỹ thuật này đòi hỏi phải có máy móc, trang thiết bị và kỹ thuật viên có tay nghề cao. Hiện nay, kỹ thuật sắc ký miễn dịch là một trong những kỹ thuật rất thông dụng được thực hiện tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng đáp ứng được yêu cầu chẩn đoán sơ bộ sớm giúp các bác sĩ lâm sàng đưa ra các phác đồ điều trị cho bệnh nhân kịp thời.

### 2.1. Kỹ thuật sắc ký miễn dịch

2.1.1. *Mục đích:* phát hiện định tính virus cúm A, B trong bệnh phẩm đường hô hấp của người bệnh.

#### 2.1.2. Nguyên lý

Thử nghiệm Clearview Exact Influenza A & B là thử nghiệm sắc ký miễn dịch trên màng sử dụng nguyên lý bánh kẹp để phát hiện kháng nguyên A & B của virus cúm. Kháng nguyên của virus cúm sẽ di chuyển dọc theo màng nitrocellulose tới vùng phản ứng để kết hợp với kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng virus cúm được cố định trên màng, đồng thời gắn với chất cộng hợp gắn keo vàng được phủ bởi kháng thể đơn dòng kháng virus cúm A & B tạo thành phức hợp miễn dịch Ab-Ag-Ab gắn keo vàng có màu đỏ hoặc hồng có thể nhìn thấy được bằng mắt thường. Tại vùng chứng phải luôn luôn xuất hiện vạch màu đỏ/hồng để chứng tỏ thanh thử có giá trị.

2.1.3. *Bệnh phẩm:* tăm bông ngoáy họng.

#### 2.1.4. Vật liệu và trang thiết bị

- Que tăm bông lấy bệnh phẩm.
- Ống nghiệm (được cung cấp sẵn trong bộ kit).

2.1.5. *Sinh phẩm:* bộ sinh phẩm chẩn đoán Clearview.

1.	Thanh thử phản ứng
2.	Dung dịch tách chiết mẫu
3.	Ông nghiệm đựng mẫu bệnh phẩm
4.	Giá đỡ ông nghiệm
5.	Que tăm bông chứng dương và chứng âm
6.	Que tăm bông lấy bệnh phẩm

#### 2.1.6. Quy trình

Bước	Nội dung thực hiện
1.	Bỏ số test cần làm ra ngoài để ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi làm.
2.	Đặt ông nghiệm vào giá đỡ.
3.	Nhỏ 6 giọt dung dịch tách chiết (R1) vào tube có sẵn trong bộ kít
4.	Nhúng tăm bông có chứa bệnh phẩm vào tube và xoay tròn tăm bông trong 10 giây, vừa xoay vừa ấn tăm bông vào đáy và thành bên của tube.
5.	Xoay tròn và ép que tăm bông vào thành bên của tube sau đó bỏ que tăm bông đi.
6.	Đặt thanh thử vào trong tube thuỷ tinh theo hướng mũi tên xuống dưới. Không di chuyển thanh thử cho tới khi đọc kết quả.
7.	Nhận định kết quả sau 15 phút (xem hình minh họa). <u>Không được đọc kết quả sau quá 20 phút.</u>

#### 2.1.7. Diễn giải và đọc kết quả

- Âm tính: chỉ xuất hiện vạch màu đỏ/hồng ở vùng chứng (C)
- Dương tính:
  - + Cúm A dương tính: xuất hiện 2 vạch màu đỏ/hồng, một vạch ở vùng A (vùng cách xa vạch chứng) và một vạch ở vùng chứng (C).
  - + Cúm B dương tính: xuất hiện 2 vạch màu đỏ/hồng, một vạch ở vùng B (vùng gần vạch chứng) và một vạch ở vùng chứng (C).
  - + Cúm A & B dương tính: xuất hiện 3 vạch màu đỏ/hồng, một vạch ở vùng A (A), một vạch ở vùng B (B) và một vạch ở vùng chứng (C).
- Không có giá trị: Khi không xuất hiện vạch chứng. Trong trường hợp này phải bỏ thanh thử đi và làm lại test khác theo đúng các bước từ 1 đến 7.

### *2.1.8. Ưu, nhược điểm*

#### **Ưu điểm**

- Đơn giản, dễ thực hiện
- Không đòi hỏi trang thiết bị
- Có thể phân biệt được cúm A & B
- Thời gian cho kết quả nhanh: Sau 15 phút

#### **Nhược điểm**

- Không lưu trữ được kết quả.
- Âm tính giả: Lượng virus đào thải ra ngoài quá thấp, hoặc do sai sót trong quá trình lấy và xử lý mẫu.

## CHƯƠNG V CÁC KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM KÝ SINH TRÙNG

### Bài 36 XÉT NGHIỆM PHÂN TÌM KÝ SINH TRÙNG ĐƯỜNG RUỘT

#### Mục tiêu

1. Trình bày được các khái niệm cơ bản về ký sinh trùng, vật chủ và hiện tượng ký sinh.
2. Thực hiện được kỹ thuật xét nghiệm tìm ký sinh trùng đường ruột.
3. Nhận biết được một số loại ký sinh trùng đường ruột, đơn bào hay gấp ở người.

#### 1. Định nghĩa và các khái niệm cơ bản về ký sinh trùng y học

##### 1.1. Định nghĩa

Ký sinh trùng là những sinh vật sống nhờ vào các sinh vật khác sống chiếm các chất của sinh vật đó để sống, phát triển và sinh sản.

##### 1.2. Các khái niệm về ký sinh trùng

- Sinh vật phải ký sinh vào một sinh vật khác để tồn tại và phát triển, được gọi là ký sinh trùng (KST).
- Sinh vật mà bị ký sinh trùng ký sinh hay sống nhờ, được gọi là vật chủ của ký sinh trùng.
- Vì ký sinh trùng là những sinh vật nên chúng có thể thuộc giới động vật hoặc là thực vật tùy loại.
- Đối tượng nghiên cứu ký sinh trùng của bài giảng này là những ký sinh trùng gây bệnh hoặc truyền bệnh cho người ở đường tiêu hóa.

##### 1.3. Khái niệm về hiện tượng ký sinh

###### 1.3.1. Định nghĩa

- Hiện tượng ký sinh là một sinh vật phải ký sinh hay sống nhờ vào sinh vật khác để tồn tại và phát triển.

###### 1.3.2. Đặc điểm của hiện tượng ký sinh

Hiện tượng ký sinh là một hiện tượng đặc biệt xảy ra khi một sinh vật thì hoàn toàn được lợi, còn sinh vật khác thì hoàn toàn bị thiệt hại.

## 2. Một số kỹ thuật xét nghiệm phân tìm ký sinh trùng đường ruột

### 2.1. Kỹ thuật xét nghiệm phân trực tiếp

#### 2.1.1. Nguyên lý

Dùng NaCl 0,9% để hoà tan phân. Vì NaCl 0,9% là môi trường giống như môi trường trong cơ thể, nên các thể hoạt động của đơn bào, áu trùng giun lươn nếu như có trong phân sẽ sống và chuyển động khi đó sẽ dễ dàng phát hiện được dưới kính hiển vi quang học.

#### 2.1.2. Bệnh phẩm

Bệnh phẩm được chỉ định xét nghiệm: Phân.

#### 2.1.3. Vật liệu/Trang thiết bị

Trang thiết bị: kính hiển vi quang học.

Vật liệu:

- NaCL 0,9% hoặc lugol 1%.
- Lam kính, lá kính.
- Lọ đựng bệnh phẩm.
- Khay đựng bệnh phẩm.
- Dụng cụ thuỷ tinh chứa dung dịch sát khuẩn chloramin B 5%.
- Các loại dụng cụ khác.

#### 2.1.4. Quy trình:

- Ghi tên hoặc số thứ tự bệnh phẩm vào góc trái của lam kính.
- Nhỏ một giọt NaCL 0,9% lên giữa lam kính.
- Dùng que lấy một lượng phân (bao kín đầu que) day lên trên giọt NaCL 0,9% đến khi đục (không làm móng quá hoặc làm dày quá).

- Đặt lammen lên trên giọt dung dịch.
- Quan sát kính hiển vi vật kính 10X- 40X.

#### Một số điều cần chú ý khi lấy bệnh phẩm và thao tác:

- Lấy bệnh phẩm và bảo quản đúng quy trình.
- Kiểm tra thời gian từ lúc lấy bệnh phẩm đến lúc đưa đến phòng xét nghiệm.

- Khi thao tác lấy nơi nghi ngờ nhất (chỗ có máu, nhày máu..).
- Nếu phân lỏng, nước, không cần nhỏ NaCL 0,9% hoặc lugol 1%, mà lấy luôn phân vào lam kính.

#### *2.1.5. Đánh giá kết quả*

Khi soi bằng kính hiển vi quang học ở vật kính 10X- 40X ta thấy một số hình ảnh KSTĐR hay gặp ở người như sau:

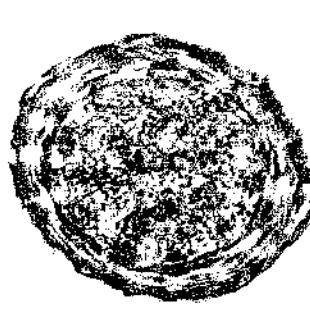
- Các loại trứng giun: giun đũa, giun móc/mỏ, giun tóc, giun kim, ấu trùng giun lươn...
- Các loại trứng sán: sán lá gan nhỏ, sán lá gan lớn, sán lá ruột, sán dây lợn, sán dây bò..
- Các đơn bào: amip, trùng roi đường ruột, nấm..

Nếu thấy các loại KST thì ghi rõ loại. Riêng nấm thì đánh giá mức độ nhiễm dựa vào mật độ. Ví dụ: tế bào nấm (+++).

### **3. Đặc điểm một số loài ký sinh trùng và đơn bào đường ruột thường hay gặp khi làm xét nghiệm phân trực tiếp**

#### **3.1. Giun đũa**

- Giun đũa trưởng thành cơ thể hình ống, màu hồng nhạt, con cái đuôi thẳng, kích thước 20 - 25cm × 5 - 6mm. Con đực đuôi cong, kích thước 15 - 17cm × 3 - 4mm.
- Trứng giun đũa hình bầu dục màu vàng, vỏ dày, xù xì. Kích thước từ 60 -70 × 35 -50 µm.



**Hình 33. Trứng giun đũa trưởng thành**



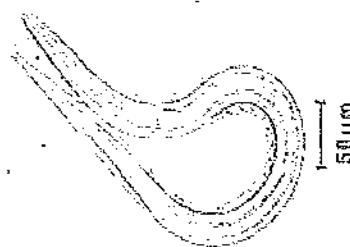
**Hình 34. Trứng giun đũa chưa thụ tinh**

#### **3.2. Giun móc/mỏ**

- *Giun móc*: Con cái kích thước từ  $10-15 \times 0,6$  mm, đuôi thẳng. Con đực kích thước  $7-10 \times 0,5$  mm, đuôi xoè ra như hình chân ếch và có 2 gai sinh dục ở đuôi.
- *Giun mỏ*: Nhìn đại thể khó phân biệt với giun móc, nó nhỏ và ngắn hơn giun móc. Con cái kích thước  $8-10,5 \times 0,5$  mm. Con đực kích thước  $5-10 \times 0,4$  mm.
- Trứng có kích thước  $60 \times 40$   $\mu\text{m}$ . Nhân chia 4-8 phần.



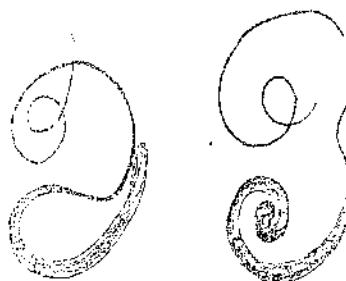
*Hình 35. Trứng giun móc/mỏ*



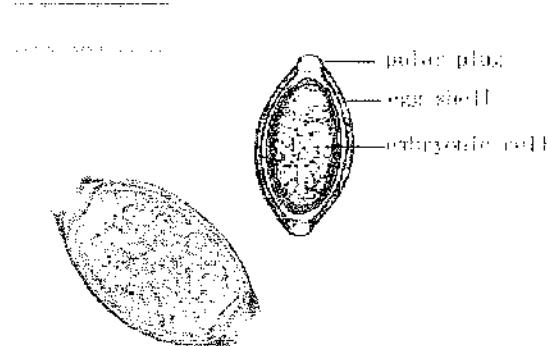
*Hình 36. Ấu trùng giun móc/mỏ*

### 3.3. Giun tóc

- Giun tóc trưởng thành là loại giun nhỏ, dài 30-50 mm, phần đầu nhỏ như sợi tóc, phần đuôi phình to hơn. Con cái đuôi thẳng, con đực đuôi cong.
- Trứng hình quả cau, vỏ dày. KT  $50-22$   $\mu\text{m}$ , màu vàng.



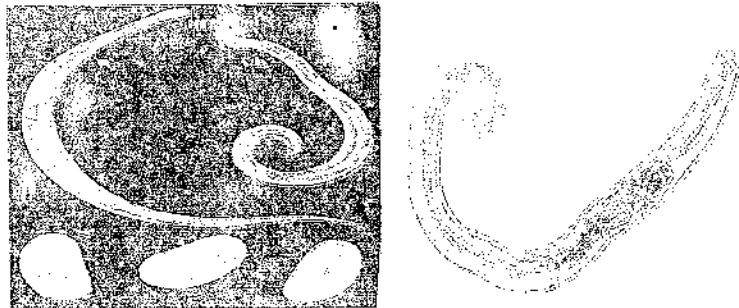
*Hình 37. Giun tóc*



*Hình 38. Trứng giun tóc*

### 3.4. Giun kim

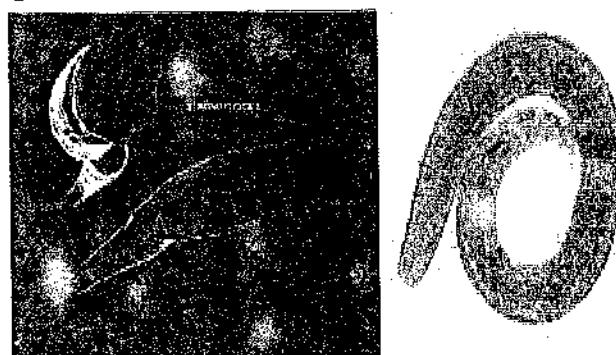
- Giun kim trưởng thành rất nhỏ, màu trắng. Con cái dài 9-11 mm, đuôi thẳng. Con đực dài 3-5 mm, đuôi cong về phía bụng, cuối đuôi có gai sinh dục.
- Trứng giun kim có hình bầu dục bị lép một góc, màu trắng trong nên trông giống như hình hạt gạo nếp. Trứng dài  $50-60$   $\mu\text{m}$  và rộng  $30-35$   $\mu\text{m}$ .



*Hình 39. Giun kim và trứng giun kim*

### 3.5. Ấu trùng giun lươn

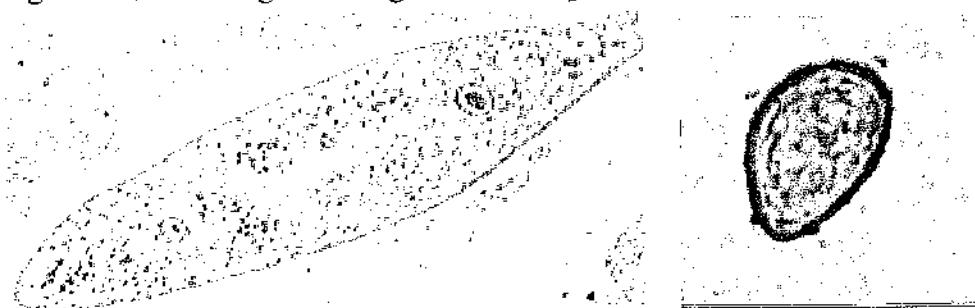
- Ấu trùng giun lươn trong đất chui qua da người, đến phổi và được nuốt xuống ruột.
- Trong ruột non chúng lột xác 2 lần và trở thành giun cái trưởng thành. Giun cái sống bám vào biểu mô của ruột non và đẻ trứng qua sinh sản đơn tính, trứng sẽ nở ra ấu trùng. Ấu trùng giun lươn có thể, hoặc được phóng thích qua phân để sống vòng đời tự do bên ngoài, hoặc gây ra tình trạng tự nhiễm.



*Hình 40. Ấu trùng giun lươn*

### 3.6. Sán lá gan nhỏ: Kích thước 10-25 x 3-4 mm.

- Trứng hình hạt vừng, màu vàng. KT: 27 x 18 $\mu$ m. Đầu trên có nắp, đầu dưới có gai nhỏ, nhân ở giữa trứng, vỏ có 2 lớp.



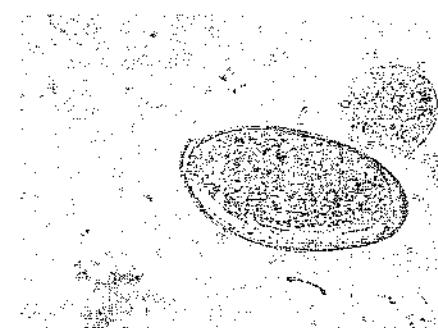
*Hình 41. Sán lá gan nhỏ và trứng sán lá gan nhỏ*

### 3.7. Sán lá gan lớn

Ký sinh trùng SLGL *Fasciola gigantica*, *Fasciola hepatica* có trong cá nước lợ, chủ yếu hơn trong các loại rau sống trong nước (cải xoong, ngô, rau om, rau cần, ngó sen). Đây là loại sán có kích thước lớn nhất trong họ sán lá, chiều dài từ 2-5cm, chiều rộng khoảng 1cm.



Hình 42. Sán lá gan lớn



Hình 43. Trứng sán lá gan lớn

### 3.8. Sán lá ruột: sán lá ruột có hình lá, màu hơi đỏ, dài 20-70 mm, rộng 8-12 mm, dày 0,5 - 3mm.

- Trứng Sán lá ruột hình bầu dục, vỏ mỏng, màu vàng nhạt, có nắp. Nhân ở giữa trứng. Kích thước: 125 x 75  $\mu\text{m}$ .



Hình 44. Sán lá ruột

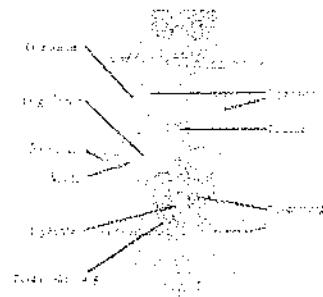


Hình 45. Trứng sán lá ruột

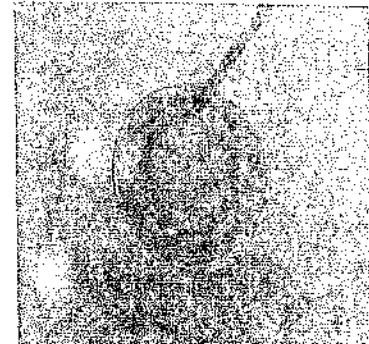
### 3.9. Sán dây bò, lợn

**Sán dây bò:** dài 4 -12 m, có khoang trên 1000 đốt, đầu rất nhỏ có 4 giác bám. Trứng sán có hình tương đối tròn, màu vàng, KT  $40 \times 30 \mu\text{m}$ , vỏ gồm hai lớp, giữa trứng có nhân, có thể thấy vết móc của ấu trùng 6 móc.

**Sán dây lợn:** dài 2-3 m (có thể tới 8 m), có thể đến 900 đốt, đầu rất nhỏ, có vòng móc và 4 hár khâu. Đốt già KT  $10-12 \times 5-6 \text{ mm}$ , đốt già có chúa tử cung ở trong. Tử cung chia 12 nhánh. Trứng hình tròn màu vàng, vỏ có 2 lớp, bên trong có nhân hoặc ấu trùng 6 móc, đường kính  $30-35 \mu\text{m}$ . Trứng thường nằm trong đốt sán, phải nghiên đốt sán mới thấy.



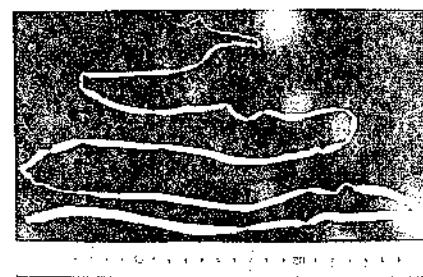
**Hình 46. Đốt sán dây**



**Hình 47. Trứng sán dây**

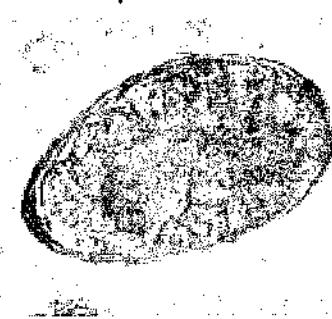


**Hình 48. Đầu sán dây lợn**



**Hình 49. Sán dây\***

- Ngoài ra, cũng có thể thấy trứng sán lá phổi do bệnh nhân bị nhiễm sán lá phổi, sán đẻ trứng vào đờm và bệnh nhân nuốt đờm có lẫn trứng sán, trứng sán theo phân ra ngoài. Hơi giống trứng giun đũa chưa thụ tinh.
- Trứng SLP hình bầu dục, màu nâu vàng, vỏ mỏng có nắp ở đầu trên. KT 80-100 × 50-60 µm.



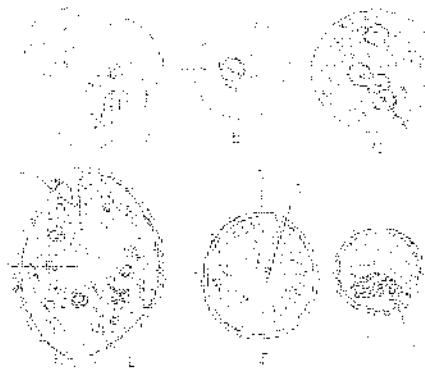
**Hình 50. Trứng sán lá phổi**

### 3.10. Amíp đường ruột

**Thể hoạt động ăn hồng cầu (thể Magna):** thể này có kích thước từ 20 - 40µm, soi tươi thấy di chuyển nhanh theo một hướng nhất định. Đây là thể gây bệnh và thường thấy trong phân người bị bệnh ly amíp cấp tính.



*Hình 51. Amíp thể hoạt động*

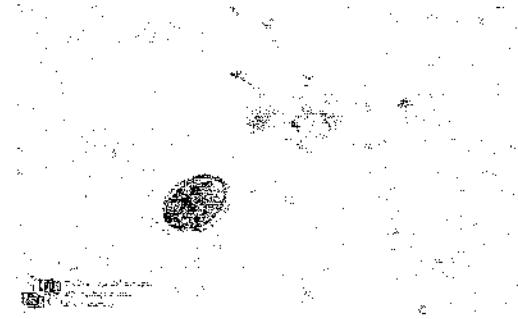


*Hình 52. Bào nang amíp*

### 3.11. Trùng roi đường ruột



*Hình 53. Giardia intestinalis*

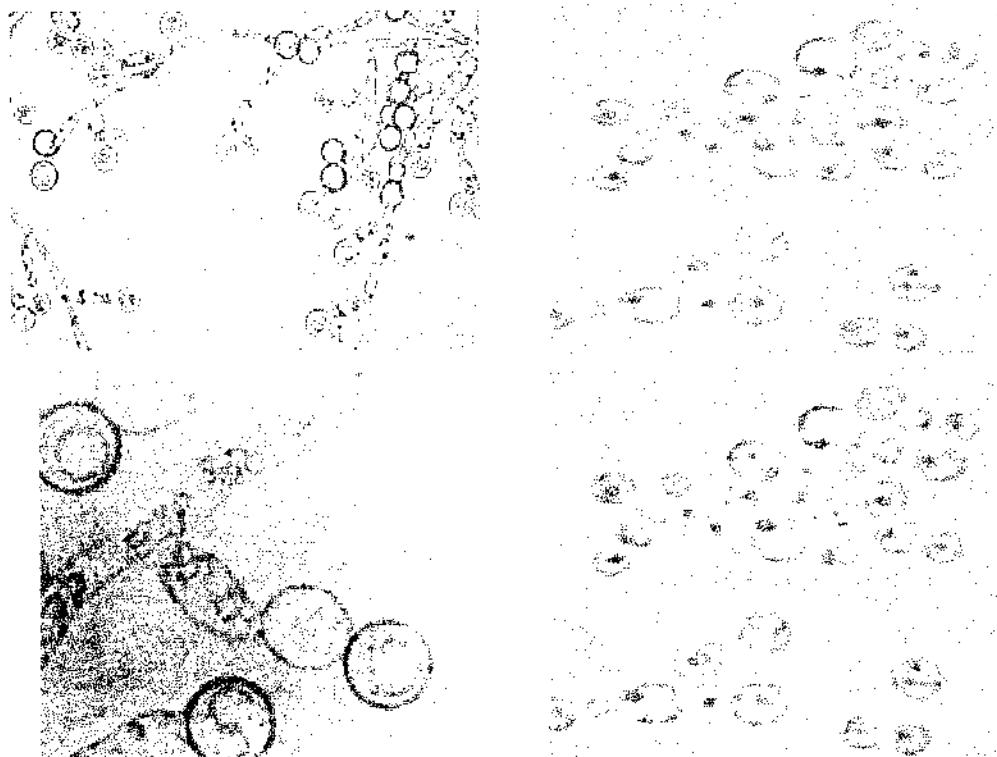


*Hình 54. Bào nang Giardia intestinalis*

- Có nhiều loại nhưng gây bệnh chủ yếu là: *Giardia intestinalis*.
- Thể hoạt động, *Giardia intestinalis* có hình thể đối xứng, có hai nhân như hai mắt kính, có 8 roi, kích thước từ 10-20  $\mu\text{m}$  chiều dài và từ 6-10  $\mu\text{m}$  chiều ngang. Thường thấy hình ảnh di chuyển rất nhanh khi soi trực tiếp bằng NaCl 8,5%.
- Bào nang có hình bầu dục; kích thước dài từ 8-12  $\mu\text{m}$ , ngang từ 7-10  $\mu\text{m}$ . Có từ 2-4 nhân và có thể thấy được một số roi trong bào nang.

### **3.12. Nấm đường ruột**

- Có nhiều loại nấm có thể gây bệnh cho người, thường gặp nhất là nấm *Candida*.
- Nấm *Candida* hình cầu hoặc hình oval, thỉnh thoảng dạng hình ống, kích thước  $3,5-6 \times 6-10\mu\text{m}$ , sinh sản bằng mọc chồi.
- *Candida* có khoảng 300 loài, thường hội sinh ở một số cơ quan tiêu hoá, hô hấp và trên da, một số có thể gặp trong môi trường tự nhiên.



**Hình 55. *Candida albicans***

## **4. Kỹ thuật xét nghiệm phân trực tiếp tìm ký sinh trùng đường ruột bằng lugol 1%**

Kỹ thuật này thao tác giống như: kỹ thuật xét nghiệm phân trực tiếp bằng nước muối sinh lý ( $\text{NaCl} 0,9\%$ ). Ta chỉ thay nước muối sinh lý ( $\text{NaCl} 0,9\%$ ) bằng lugol 1%. Khi dùng lugol 1% ta sẽ thấy hình ảnh một số loại ký sinh trùng như: Trứng sán lá gan nhỏ, các bào nang amip, bào nang Giardia bắt màu ánh vàng nên dễ phát hiện hơn.

## **5. Kỹ thuật xét nghiệm phân bằng phương pháp phong phú (WILLIS)**

Đây là kỹ thuật bổ trợ cho kỹ thuật xét nghiệm phân trực tiếp. Trong cùng lọ bệnh phẩm sau khi làm kỹ thuật trên, bước tiếp theo sẽ làm kỹ thuật phong phú.

#### **5.1. Nguyên lý**

Dùng NaCl 40% (nước muối bão hòa) có tỷ trọng lớn hơn tỷ trọng của trứng giun vì vậy sẽ làm cho trứng giun nổi lên trên bề mặt của dung dịch.

#### **5.2. Bệnh phẩm**

Bệnh phẩm được chỉ định xét nghiệm tìm trứng giun là: phân.

#### **5.3. Vật liệu/trang thiết bị**

Trang thiết bị: kính hiển vi quang học.

Vật liệu:

- Bút viết kính.
- Lam kính, lá kính.
- Lọ đựng bệnh phẩm.
- Que làm xét nghiệm.
- Giá để lam kính.
- Khay đựng bệnh phẩm.
- Các loại dụng cụ khác.
- Dụng cụ thuỷ tinh chứa dung dịch sát khuẩn chloramin B 5%.

#### **5.4. Hóa chất**

NaCl 40% (nước muối bão hòa).

#### **5.5. Quy trình**

- Lấy một lượng phân không nhiều quá 1/3 lọ đựng bệnh phẩm, nếu lượng phân nhiều quá tỷ trọng nước muối sẽ bị giảm và kết quả xét nghiệm sẽ không chính xác.

- Cho một ít NaCl 40% vào lọ đựng bệnh phẩm, dùng que đánh tan bệnh phẩm.

- Nhỏ tiếp NaCl 40% vào gần đầy lọ gạt bỏ bệnh phẩm nổi trên bề mặt sau đó nhỏ NaCl 40% hơi vòng lên miệng lọ sao cho khi đậy lam men lên nước muối không bị tràn ra ngoài.

- Đậy lam men lên trên lọ bệnh phẩm trong 15 phút (tránh để lâu quá các

loại trứng sẽ bị chìm trở lại.).

- Nhắc la men đặt trên lâm kính, soi kính.

### **5.6. Đánh giá kết quả**

Kỹ thuật này chủ yếu phát hiện các loại trứng giun đũa, trứng giun tóc, trứng giun móc/mó . Không hiệu quả với các loại bào nang của đơn bào, trứng sán.

#### ***Đánh giá tương đối mức độ nhiễm như sau:***

- Dựa vào số lượng trứng giun trên một vi trường:

- + 1 - 3 trứng / vi trường : (+)
- + 3 - 5 trứng / vi trường : (++)
- + 6 - 20 trứng / vi trường : (+++)
- + >20 trứng / vi trường : (++++)

- Ngoài các phương pháp trên còn có một số phương pháp khác như: Kato...

Bài 37

## KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM MÁU TÌM KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT (KSTSR)

### Mục tiêu

1. Mô tả được một số đặc điểm sinh học cơ bản của KSTSR.
2. Trình bày được các phương pháp nhuộm giemsa.
3. Nhận biết và phân biệt được hình thể một số loài KSTSR hay gặp ở người.
4. Trình bày được cách ghi kết quả xét nghiệm KSTSR.

Bệnh sốt rét được biết từ lâu trong lịch sử, từ thời Hippocrate đã mô tả bệnh sốt rét. KSTSR do Laveran (Pháp) phát hiện vào năm 1880, Sau đó Romanosky (Nga) tìm ra kỹ thuật nhuộm KSTSR năm 1891. Năm 1897, Ross (Anh) đã chứng minh được bệnh sốt rét do muỗi truyền.

### 1. Đặc điểm sinh học của KSTSR

#### 1.1. Phân loại KSTSR

- KSTSR thuộc giới động vật, ngành đơn bào (Protozoa), lớp bào tử trùng (Sporozoa), họ Plasmodidae và giống plasmodium.

- KSTSR không những gây bệnh cho người mà cả cho súc vật.

Khoảng gần 100 loài gây bệnh cho súc vật: bốn loài ở động vật có vú, bốn loài ở các loài chim, 16 loài ở bò sát và hai loài ở ếch nhái.

Có bốn loại KSTSR gây bệnh cho người:

- *Plasmodium falciparum*.
- *Plasmodium vivax*.
- *Plasmodium malariae*.
- *Plasmodium ovale*.

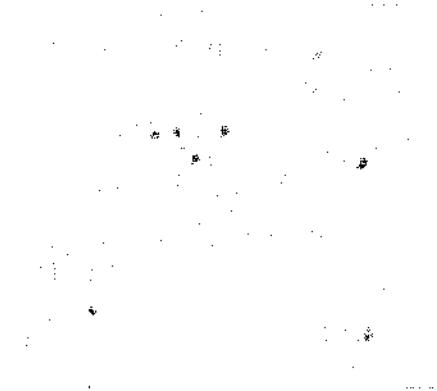
#### 1.2. Cấu tạo và hình thể của KSTSR:

- Cấu tạo của KSTSR gồm 3 thành phần:
  - + Nhân.
  - + Nguyên sinh chất.
  - + Hạt sắc tố.

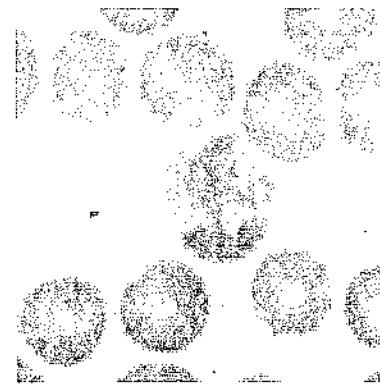
- Hình thể của KSTSР trong hồng cầu:
  - + Thể tư dưỡng (thể nhẫn – Trophozoid).
  - + Thể phân liệt (Schizonte).
  - + Thể giao bào (Gametocyte).

### **I.3. Đặc điểm ký sinh trong HC của KSTSР**

- Loại P. Falciparum và P.Malariae không làm thay đổi hình thể và kích thước hồng cầu.
- Loại P. Vivax và P.Ovale. làm HC bị trương to, méo mó và nhạt sắc.



**Hình 56. P.falciparum**



**Hình 57. P.vivax**

## **2. Kỹ thuật nhuộm Giemsa tìm ký sinh trùng sốt rét**

### **2.1. Bệnh phẩm**

Bệnh phẩm được chỉ định xét nghiệm tìm ký sinh trùng sốt rét là: Máu và có thể là tuỷ xương.

### **2.2. Vật liệu/Trang thiết bị**

2.2.1. Trang thiết bị: kính hiển vi quang học.

#### **2.2.2. Vật liệu:**

- Lam kính sạch.
- Kim chích máu.
- Bông thấm vô trùng.
- Bút viết kính.
- Bút chì vót nhọn
- Giá đế lam.
- Ống đựng máu có chứa chất chống đông.

- Bom kim tiêm loại 5ml.
- Que thuỷ tinh.

### *2.2.3. Hoá chất:*

- Cồn 96°.
- Cồn 70°.
- Dung dịch giemsa cốt.
- Dung dịch đệm pH=7,2.

**2.3. Nguyên lý:** khi nhuộm bằng giemsa, nhân KSTSR sẽ bắt màu đỏ, nguyên sinh chất bắt màu tím.

### *2.4. Quy trình*

#### *2.4.1. Kỹ thuật lấy máu*

Thời gian lấy máu: lấy máu bất kể lúc nào bệnh nhân đến bệnh viện, nhưng lấy tốt nhất vào lúc bệnh nhân đang lên con sốt, chưa dùng thuốc điều trị sốt rét. Có thể lấy máu theo hai cách:

*Lấy máu mao mạch:* vị trí lấy máu thường ở mặt bên đầu ngón tay thứ tư bàn tay trái. Trẻ em lấy ở dái tai, gót chân.

*Lấy máu tĩnh mạch:* lấy máu cho vào ống đựng máu có chứa chất chống đông.

#### *2.4.2. Kỹ thuật làm tiêu bản*

Để xét nghiệm tìm ký sinh trùng sốt rét thường làm tiêu bản giọt đặc và tiêu bản giọt đòn.

*Với cách lấy máu mao mạch:*

- Sát khuẩn vị trí lấy máu bằng cồn 70° rồi để khô hoặc lau khô bằng bông vô khuẩn rồi mới được chích máu.
- Loại bỏ giọt máu đầu tiên.
- Lấy giọt máu thứ 2 bằng cách áp lam vào vị trí chích máu (Vị trí 1/3 phía trên của lam kính).
- Lấy giọt máu thứ 3 bằng  $\frac{1}{2}$  giọt máu thứ 2 cho vào lam cách giọt máu trước trên lam khoảng 1cm.

*Đối với máu lấy bằng đường tĩnh mạch:*

- Dùng que thuỷ tinh khuấy nhẹ cho máu và huyết tương thật đều nhau.
- Dùng que thuỷ tinh chấm 2 giọt máu lên lam kính và các thao tác giống

nhiều kỹ thuật lấy máu mao mạch.

*Lưu ý: nếu máu bệnh nhân quá loãng do thiếu máu thì để ống máu lắng rồi chắt bớt đi một ít huyết tương để giọt đặc không bị trôi khi nhuộm giemsa.*

#### 2.4.2.1. Kỹ thuật làm giọt máu đòn

Tay trái cầm hai đầu của lam máu, tay phải cầm 2 cạnh của lam kính khác, đặt mép của lam này với tiếp tuyến bờ trái của giọt máu thứ 3 tạo thành một góc  $45^{\circ}$ , để cho giọt máu lan đều cạnh lam, sau đó đẩy nhẹ và thật nhanh lam kính từ phải sang trái tạo thành một lưỡi máu đòn đều.

#### 2.4.2.2. Kỹ thuật làm giọt máu đặc

– Dùng góc của lam kính đang cầm ở tay phải đặt vào trung tâm giọt máu thứ 2, đánh giọt máu theo đường vòng tròn đều từ trong ra ngoài sao cho đường kính giọt máu mới khoảng 1cm.

- Sau đó để cả giọt đặc và giọt đòn thật khô (nếu muốn nhanh có thể sấy nhẹ hoặc hơ nhẹ trên đèn cồn tránh không để nóng quá sẽ làm KST biến dạng).

- Lấy bút kính viết tên, tuổi BN vào góc dưới của lam kính và lấy bút chì viết tên, tuổi B/N vào mặt giọt đòn (khoảng phía dưới 1/3 của giọt đòn) để đề phòng lúc nhuộm phần viết bút mực bị trôi, nhòe mất chữ sẽ bị nhầm lẫn.

- Nghiêng lam khoảng  $45^{\circ}$  rồi lấy cồn  $96^{\circ}$  nhỏ nhẹ lên giọt đòn (Chú ý không làm cồn rây sang giọt đặc. Nếu giọt đặc bị đính cồn khi nhuộm sẽ bị đen và không soi được).

#### *Mục đích của làm giọt máu đặc và giọt máu đòn:*

- *Giọt đặc:* tập trung nhiều hồng cầu nên ký sinh trùng sốt rét cũng được tập trung nhiều hơn, do đó xác định nhanh và thuận lợi.

- *Giọt đòn:* hồng cầu được đòn đều, cố định, do đó thấy rõ hình dạng, kích thước KST và dễ dàng định loại được ký sinh trùng.

- Đếm tỷ lệ hồng cầu bị nhiễm KST, có khi bị nhiễm quá nhiều.

#### 2.5. Nhuộm lam

- Có thể pha thuốc nhuộm Giemsa cốt với dung dịch đệm pH=7,2 theo các tỷ lệ khác nhau tùy theo mục đích.

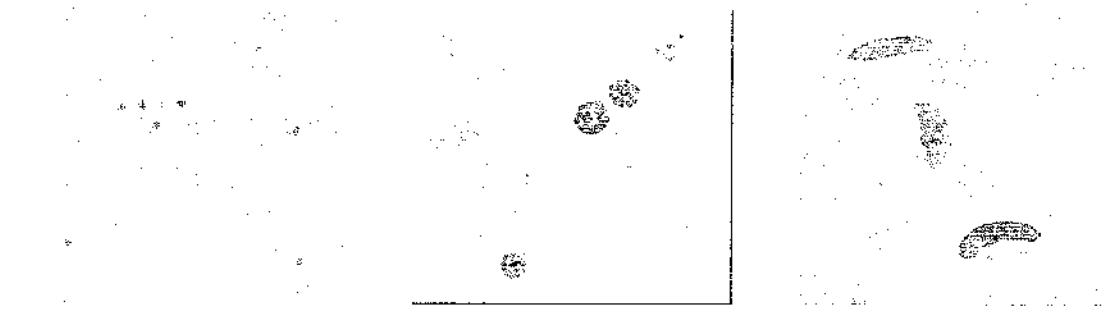
- Thông thường nhuộm: tỷ lệ: 10%, thời gian nhuộm là 8-10 phút (cần chẩn đoán nhanh).

- Nhuộm châm: tỷ lệ 3% thời gian nhuộm là: 45 phút (Cách này để bảo quản lam được lâu).
- Để lam khô rồi nhỏ nhẹ nhàng thuốc nhuộm sao cho phủ kín hết cả giọt đòn và giọt đặc tránh ít quá nhuộm không đảm bảo và nhiều quá thuốc nhuộm tràn ra ngoài.

## 2.6. Ý nghĩa kết quả và báo cáo

Soi tìm KTSR ở vật kính 100X tìm thể nhẵn, thể phân liệt, thể giao bào của các loài KST sốt rét.

2.6.1. Đối với *P.falciparum*: thường chỉ thấy hai thể: nhẵn và giao bào, ít khi thấy thể phân liệt (schizonte) nếu thấy là bệnh nhân rất nặng.



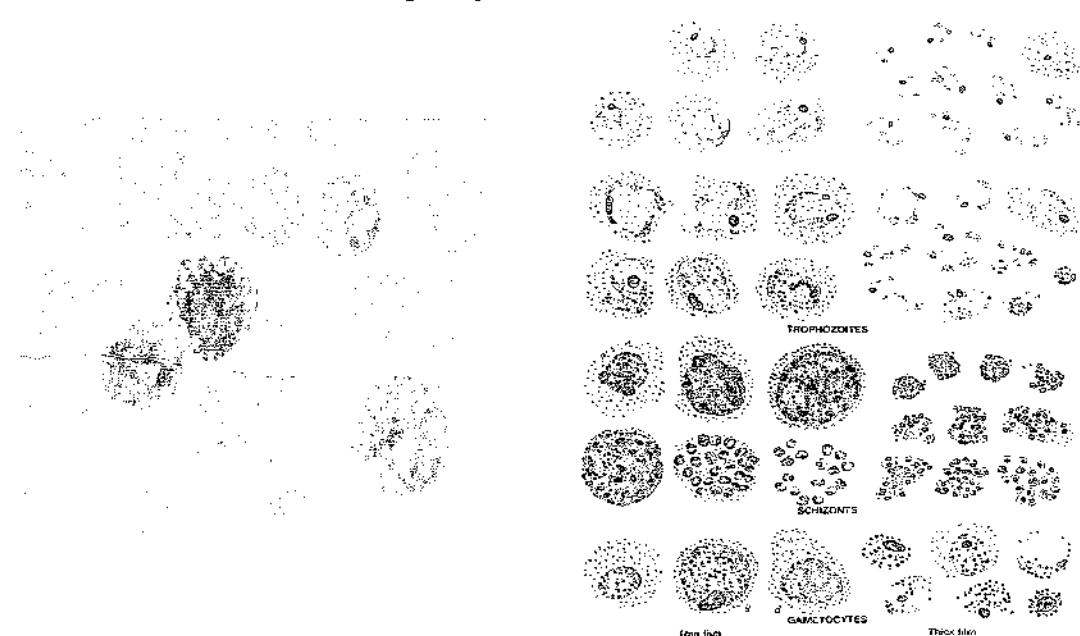
Thể nhẵn *P.f*

Thể schizonte *P.f*

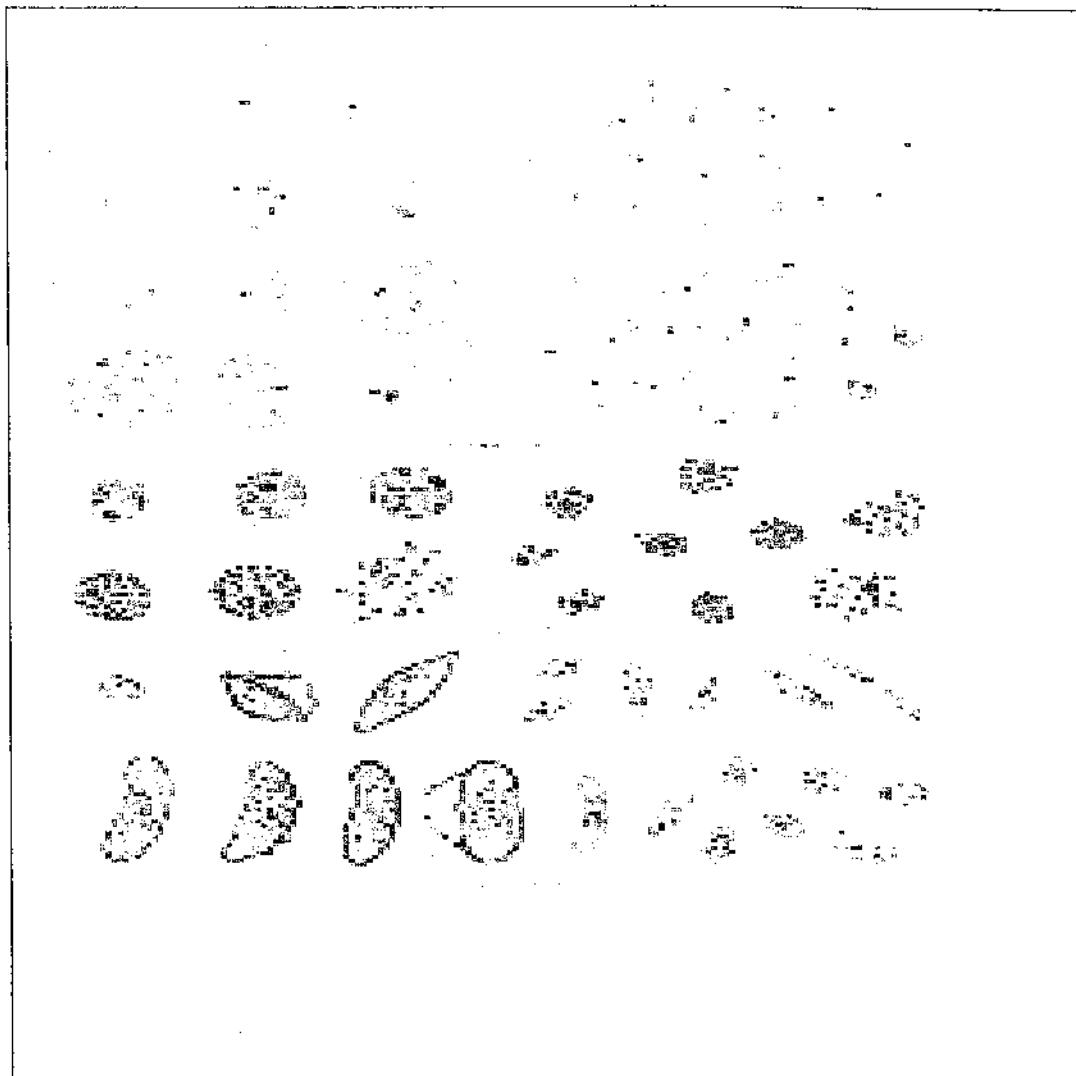
Thể giao bào *P.f*

Hình 58. Các thể của KTSR *P. falciparum*

2.6.2. Đối với *P.vivax*: thường thấy cả ba thể.



Hình 59. Các giai đoạn phát triển của ký sinh trùng sốt rét trong hồng cầu



#### 2.6.3. Đánh giá mật độ KSTSR ở giọt máu đặc theo bốn mức độ:

- Thấy 1 - 10 KST trên 100 vi trường: (+).
- Thấy 11 - 100 KST trên 100 vi trường: (++) .
- Thấy 1 - 10 KST trên 1 vi trường: (+++).
- Thấy > 10 KST trên 1 vi trường : (++++) .
- Không tìm thấy KST: Kết luận chưa tìm thấy KSTSR.

2.6.4. Cách ghi kết quả: rất quan trọng, để bác sĩ lâm sàng tiên lượng bệnh và ra phác đồ điều trị thích hợp cho bệnh nhân. Nhất là đối với P.falciparum.

##### 2.6.4.1. Đối với P.falciparum:

- Nếu chỉ thấy thể tư dưỡng (Trophozoite)  
Ghi: P.f t(x+)

- Nếu thấy thêm thể phân liệt (Schizonte)

Ghi: P.f t(x+).sh(x+)

- Nếu thấy thêm cả thể giao bào (Gametocyte):

Ghi: P.f t (x+).sh (x+).g (x+)

- Chỉ có một thể giao bào (Gametocyte) Ghi: P.f g (x+)

2.6.4.2. Đối với *P.Vivax* và *P.Ovale*: hai loại này thường có cả 3 thể trong máu nên cách ghi đơn giản hơn:

Ghi: *P.vivax T.sh.g (x+)* hoặc *P.ovale T.sh.g (x+)*.

Lưu ý: khi trả kết quả đối với *P.falciparum*, nếu không ghi rõ thể cũng dẫn đến sự nhầm lẫn. Ví dụ thể giao bào không chịu tác động của thuốc diệt thể nhẫn, mà chỉ sau 45 – 60 ngày mới bị chết, thể này không gây sốt, chỉ có ý nghĩa trong dịch tễ, nếu trả kết quả là: *P.f(x+)* trong nhiều ngày bác sĩ điều trị sẽ nghĩ là KST kháng thuốc.

## **CHƯƠNG VI** **CÁC KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM NẤM**

### **Bài 38** **XÉT NGHIỆM NẤM**

#### **Mục tiêu**

1. *Trình bày được nguyên tắc và kỹ thuật lấy bệnh phẩm xét nghiệm nấm.*
2. *Trình bày được nguyên lý và các quy trình xét nghiệm trực tiếp tìm nấm.*
3. *Nhận định được kết quả.*

#### **1. Nguyên tắc lấy bệnh phẩm**

Trong xét nghiệm chẩn đoán nấm thì việc lấy mẫu rất quan trọng, kết quả xét nghiệm phụ thuộc vào cách lấy bệnh phẩm. Khi lấy bệnh phẩm phải chú ý:

- Khi sử dụng dụng cụ lấy mẫu phải tiệt trùng tránh nhiễm khuẩn hoặc nấm mốc từ môi trường xung quanh.
- Phải lấy đúng vị trí tổn thương của nấm và chú ý tiệt khuẩn nơi lấy bệnh phẩm.
- Khoảng 3-5 ngày trước khi lấy bệnh phẩm làm xét nghiệm, bệnh nhân không được sử dụng thuốc chống nấm.

#### **2. Kỹ thuật lấy bệnh phẩm**

##### **2.1. Bệnh phẩm da**

Lấy vảy da ở rìa tổn thương chỗ có tổn thương mới. Lấy bằng cách sát trùng da bằng cồn 70°, sau đó dùng dao mổ cạo da hoặc gấp vảy chỗ tổn thương, da bụng ra được hứng trên 1 phiến kính sạch.

##### **2.2. Bệnh phẩm tóc, râu, lông**

Dùng kéo để cắt tóc, râu hoặc dùng nhíp để nhổ, sau đó cho lên lam kính. Trường hợp nấm ở tóc có thêm vảy ở da đầu thì lấy cả vảy để xét nghiệm.

##### **2.3. Bệnh phẩm móng**

Dùng dao mổ để cạo lấy những mảng nhỏ của móng hoặc dùng kéo để

cắt móng thành những mảnh móng vụn cho lên lam kính. Đối với trường hợp viêm móng có mủ, ta lấy cả mủ để xét nghiệm.

#### **2.4. Bệnh phẩm là mủ, các chất dịch (dịch não tuỷ, dịch rửa phế quản, dịch màng phổi...)**

Lấy bằng cách hút chọc dò, sau đó cho vào ống nghiệm sạch.

#### **2.5. Bệnh phẩm là dịch tiết**

Một số bệnh nấm gây bệnh ở da và các khoang tự nhiên(âm đạo, tai, họng, miệng) có thể gây loét, tiết dịch, ta dùng tăm bông vô khuẩn để lấy.

#### **2.6. Bệnh phẩm là phân, nước tiểu**

Phân, nước tiểu lấy cho vào lọ sạch.

### **3. Kỹ thuật xét nghiệm trực tiếp**

#### **3.1. Dụng cụ và hoá chất**

**Dụng cụ:**

- Dao, kéo, panh, đèn cồn.
- Lam kính, lá kính.
- Bút viết kính, giá để lam kính.
- Pipet nhựa.
- Tăm bông, ống nghiệm, bơm kim tiêm.
- Bông vô trùng.

**Hoá chất:**

- Cồn 70%.
- NaCL 0,9%.
- KOH 20%.
- Mực tàu.

#### **3.2. Kỹ thuật xét nghiệm trực tiếp bằng NaCl 0,9%**

Đối với bệnh phẩm là phân, dịch tiết (dịch âm đạo) hoặc đờm loãng dùng NaCl 0,9% để làm tiêu bản. Mục đích làm loãng bệnh phẩm để quan sát nấm dễ dàng.

**Quy trình**

- Bước 1: ghi tên hoặc số thứ tự bệnh phẩm vào góc trái của lam kính.
- Bước 2: nhỏ một giọt NaCL 0,9% lên giữa lam kính.

- Bước 3: dùng que lấy một lượng phân (bao kín đầu que) hoặc đờm day lên trên giọt NaCL 0,9% đến khi đục (không làm mỏng quá hoặc làm dày quá).

Đối với bệnh phẩm là dịch âm đạo cách làm cũng tương tự như trên.

- Bước 4: đặt la men lên trên giọt dung dịch.
- Bước 5: quan sát kính hiển vi vật kính 40X.



**Hình 60.** Tế bào nấm men và sợi nấm giả trong bệnh phẩm đờm

### 3.3. Kỹ thuật xét nghiệm trực tiếp bằng KOH 20%

Kỹ thuật này dùng để xét nghiệm các loại bệnh phẩm là da, lông, tóc, móng, mủ.

#### Nguyên lý

Mẫu bệnh phẩm được hoà trong giọt KOH 20%, sẽ hoà tan với tốc độ nhanh hơn nấm vì nấm có thành tế bào dạng kítin. Có thể phân biệt được cấu trúc nấm như sợi nấm, tế bào nấm. Quá trình làm sạch mẫu bệnh phẩm có thể được tăng nhanh bằng cách hơ qua ngọn lửa đèn cồn.

#### Quy trình

- Bước 1: ghi tên hoặc số thứ tự của bệnh nhân lên góc trái của lam.
- Bước 2: lấy bệnh phẩm cần xét nghiệm đặt lên giữa lam kính. Nhỏ 1 - 2 giọt KOH 20% lên trên bệnh phẩm và trộn đều.
- Bước 3: đậy la men lên trên giọt dung dịch.

- Bước 4: để tiêu bản ở nhiệt độ phòng cho đến khi bệnh phẩm tan hết. Có thể làm ám tiêu bản bằng cách hơ qua ngọn lửa đèn còn để quá trình tan bệnh phẩm nhanh hơn.

- Bước 5: quan sát trên kính hiển vi vật kính 40X.

*Lưu ý: đối với bệnh phẩm là nước tiểu, các chất dịch (dịch não tuỷ, dịch rửa phế quản, dịch màng phổi...) ly tâm sau đó lấy cẩn cho lên lam kính lấy la men đậm lên sau đó đưa lên kính hiển vi quan sát.*

### **3.4. Kỹ thuật xét nghiệm trực tiếp bằng mực tàu**

Trong trường hợp nghi ngờ bệnh nhân bị nhiễm nấm *Cryptococcus sp* nên xét nghiệm trực tiếp bằng mực tàu.

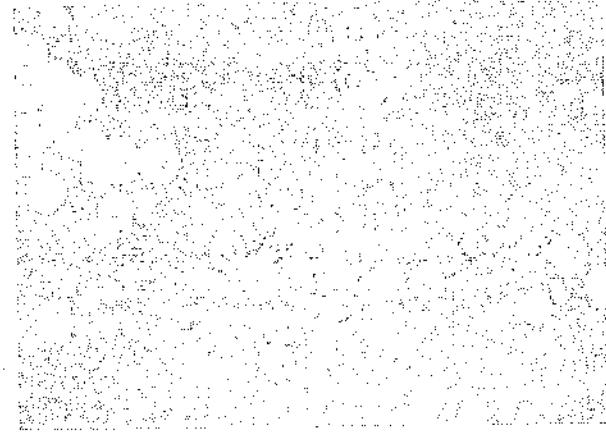
Mẫu bệnh phẩm dùng trong kỹ thuật này là các chất dịch: dịch não tuỷ, dịch rửa phế quản, dịch màng phổi...

**Nguyên lý:** mẫu bệnh phẩm được trộn trong giọt mực tàu sẽ chuyển thành màu tối do các hạt carbon trong mực. Các cấu trúc của nấm như nang và thành tế bào sẽ nổi rõ trên nền bệnh phẩm nhuộm mực.

#### **Quy trình**

- Bước 1: ly tâm mẫu bệnh phẩm tốc độ 2000 vòng/phút trong thời gian 15 phút gạn bỏ dịch trong lấy cẩn để làm tiêu bản.
- Bước 2: lấy một lam kính sạch ghi tên hoặc số thứ tự bệnh phẩm vào góc trái của lam.
- Bước 3: thêm một giọt nhỏ mực tàu và trộn đều.
- Bước 4: đặt la men lên hỗn hợp trộn và ép nhẹ để tạo thành một lớp mỏng.
- Bước 5: quan sát trên kính hiển vi vật kính 40X.

*Lưu ý: khi làm tiêu bản có màu nâu, nếu mực tàu quá đậm cần pha thêm NaCl 0,9% hoặc nước cất tỷ lệ 50%.*



**Hình 61.** *Cryptococcus neoformans* trên tiêu bản mực tàu

#### 4. Nhận định kết quả

- Soi tất cả các vi trùng theo hình ziczac từ trái sang phải từ trên xuống dưới. Quan sát ở vật kính 40X để xác định tế bào nấm, sợi nấm.
  - Kết quả dương tính: Mô tả hình thể nấm quan sát được
    - + Tế bào nấm men (+), (++) , (+++), tùy theo mức độ: Rải rác vài tế bào, nhiều tế bào, rất nhiều.
      - + Sợi nấm giả.
      - + Nấm sợi có vách ngăn.
      - + Trên tiêu bản mực tàu nếu thấy có một vòng sáng rõ nét bao quanh tế bào nấm, tế bào có thể rộng hoặc hẹp, các tế bào nấm có thể tròn hoặc bầu dục hoặc kéo dài, có chồi hoặc không và có thể tách khỏi tế bào mẹ nhưng vẫn nằm chung trong một nang kết luận: *Cryptococcus sp.*
  - Kết quả âm tính:
    - Không thấy vi nấm.

## Bài 39

# NUÔI CÁY, ĐỊNH DANH CANDIDA

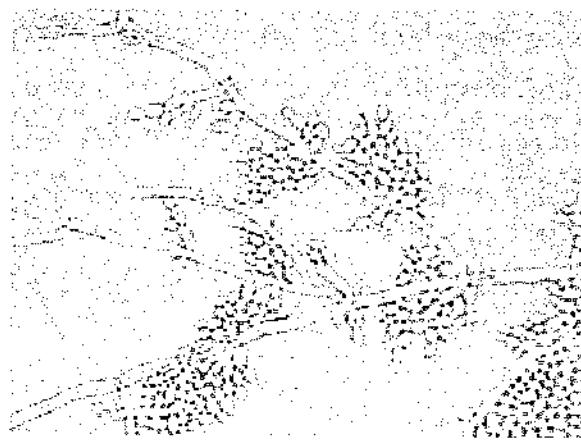
### Mục tiêu

1. *Trình bày được hình dạng, đặc điểm của nấm Candida trong xét nghiệm trực tiếp.*
2. *Trình bày được kỹ thuật nuôi cấy nấm men và quy trình định danh Candida.*

Giống *Candida* có khoảng 300 loài nhưng chỉ có khoảng trên 30 loài có khả năng gây bệnh. *Candida* thường sống hoại sinh trên da, trong ống tiêu hoá, và ở các khoang tự nhiên trong cơ thể. Chỉ gây bệnh trong những điều kiện nhất định khi gặp điều kiện thuận lợi (yếu tố sinh lý, yếu tố bệnh lý, nghề nghiệp, thuốc men). Khi đó *Candida* chuyển từ trạng thái hoại sinh sang gây bệnh. Trong giống *Candida* thì *C. albicans* là loài hay gặp nhất.

### 1. Hình thể

Nấm *Candida* là nấm men hình tròn hoặc oval đôi khi có dạng hình ống kích thước 3-6 $\mu$ m, sinh sản bằng cách nảy chồi hoặc sinh ra những sợi tơ nấm giả, trên đó mọc lên những chùm bào tử chồi.



Hình 62. *Candida sp*

### 2. Xét nghiệm trực tiếp

Đối với bệnh phẩm là phân, đờm, dịch âm đạo, niêm mạc miệng, họng, tai... làm tiêu bản soi trực tiếp bằng NaCL 0,9%.

Lấy một lam kính sạch ghi tên hoặc số thứ tự bệnh phẩm vào góc trái của lam, sau đó nhỏ 1 giọt NaCL 0,9% lên giữa lam, dùng que cây lấy bệnh phẩm đánh đều lên giọt nước muối đến khi đục lấy la men đậm lên trên.

Đối với bệnh phẩm là các loại dịch: dịch não tuỷ, dịch màng phổi, dịch phế quản, dịch màng bụng, nước tiểu phải ly tâm lấy cặn để làm tiêu bản không cần nhỏ NaCL 0,9%.

Đối với bệnh phẩm là da, mảnh sinh thiết làm tiêu bản soi trực tiếp bằng KOH 20%.

Quan sát trên kính hiển vi ở vật kính 40X tìm tế bào nấm.

### 3. Nuôi cây nấm men

#### 3.1. Dụng cụ, hóa chất

##### Dụng cụ

- Lam kính, lá kính, bút viết kính.
- Que cây.
- Giá để lam kính.
- Đèn cồn.

##### Hoá chất, môi trường

- Môi trường sabouraud có chloramphenicol.
- Dung dịch NaCL 0,9%.
- Dung dịch KOH 20%.

#### 3.2. Quy trình

- Bước 1: Lấy môi trường ra khỏi tủ lạnh để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút.
- Bước 2: ghi tên BN hoặc số thứ tự bệnh phẩm lên mặt của đĩa thạch.
- Bước 3: Mở nghiêng nắp hộp petri, dùng que cây đã tiệt trùng lấy bệnh phẩm ria lên mặt thạch, đậy nắp hộp.
- Bước 4: Chuyển đĩa cây vào trong tủ ấm 30°C, đọc kết quả sau 24 giờ - 48 giờ.

**Lưu ý:** đối với bệnh phẩm là các loại dịch: dịch não tuỷ, dịch màng phổi, dịch màng bụng, phải ly tâm lấy cặn để cây.

### 3.3. Đọc kết quả

Sau thời gian 24 giờ - 48 giờ đọc kết quả:

Quan sát đại thể: Nếu thấy khuẩn lạc nấm mọc trên đường cấy phải quan sát hình thể, tính chất, màu sắc của khuẩn lạc.

Khuẩn lạc nấm *Candida sp* có dạng tròn, nhày màu kem.

Quan sát kính hiển vi: Lấy một lam kính sạch nhỏ 1 giọt NaCl 0,9% lên giữa lam kính. Dùng que cấy vô khuẩn chạm vào khuẩn lạc nấm sau đó day nhẹ lên giọt NaCL 0,9%, đẩy la men lên trên đĩa lết kính hiển vi quan sát ở vật kính 40X tìm tế bào nấm men. Tế bào nấm men hình tròn hoặc bầu dục nẩy chồi hoặc không, cần quan sát kích cỡ và hình dạng nấm men.

## 4. Định danh *Candida*

### 4.1. Thủ nghiệm ống mầm (test mầm giá)

Đây là thủ nghiệm nhanh để xác định *C. albicans* và *C. dubliniensis*

Dụng cụ, môi trường

- Lam kính, la men.
- Que cấy.
- Ống thuỷ tinh, ống hút nhựa.
- Huyết thanh thỏ.

Quy trình

- Bước 1: cho 3 giọt huyết thanh thỏ vào trong 1 ống thuỷ tinh nhỏ.
- Bước 2: dùng que cấy vô khuẩn chạm nhẹ vào 1 khuẩn lạc nấm men, sau đó cho vào trong ống huyết thanh để tạo thành dạng nhũ tương trong huyết thanh.
- Bước 3: ủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ.
- Bước 4: dùng pipet lấy 1 giọt huyết thanh nhỏ lên lam kính, lấy la men phủ lên trên đĩa lết kính hiển vi và quan sát.

Đọc kết quả

- Thủ nghiệm dương tính: có các ống mầm bằng 1 nửa chiều rộng và dài gấp 3-4 lần chiều dài tế bào nấm men, không chia vách giữa ống mầm và tế bào nấm.
- Thủ nghiệm âm tính: chỉ thấy các tế bào nấm men.

- Kết luận : *Candida sp.*



1Qum

**Hình 63. Thử nghiệm ống mầm dương tính của *C. albicans***

#### **4.2. Định danh nấm men bằng *Candida select***

Môi trường *Candida Select* dùng cho phân lập và phân biệt *C.albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* và *C. krusei*. Do sự khác biệt về hình thái học và màu sắc các khuẩn lạc, nấm men nên môi trường này tạo thuận lợi cho việc xác định bốn loại nấm men trong bệnh phẩm.

##### **Chuẩn bị**

- Đèn côn.
- Que cây.
- Môi trường *Candida Select* 4 của Bio Rad

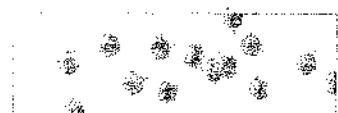
##### **Quy trình**

- Bước 1: lấy môi trường ra khỏi tủ lạnh để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút.
- Bước 2: ghi tên BN hoặc số thứ tự bệnh phẩm lên mặt của đĩa thạch.
- Bước 3: mở nghiêng nắp hộp petri, dùng que cây đã tiệt trùng chạm nhẹ vào khuẩn lạc nấm men sau đó rìa lên mặt thạch đậy nắp hộp.
- Bước 4: chuyển đĩa đã cây vào trong tủ ấm 30°C, đọc kết quả sau 24 giờ - 48 giờ.

##### **Đọc kết quả**

- Tuỳ thuộc vào loài nấm men, các khuẩn lạc sẽ có hình thái và màu sắc khác nhau.
- Khuẩn lạc tròn nhẵn bóng màu tím nhạt đến sẫm: *C. albicans*.

- Khuẩn lạc hơi dẹt nhỏ trung tâm màu đậm, bờ màu xanh nhạt: *C. glabrata*.
- Khuẩn lạc tròn nhẵn bóng màu xanh thẫm: *C. tropicalis*.
- Khuẩn lạc to bờ không đều, trung tâm khuẩn lạc màu xanh sẫm, bờ nhạt màu: *C. krusei*.
- Khuẩn lạc màu kem: *Candida sp.*



*Candida sp.*



*Candida sp.*



*Candida sp.*



*Candida sp.*

Hình 64. Đặc điểm khuẩn lạc *Candida* trên môi trường Candi Select 4 của Bio Rad

Ngoài ra, để định danh nấm men còn sử dụng bộ API 20C AUX có thể định danh được nhiều loài nấm men.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Bộ môn Vi sinh – Trường Đại học Y Hà Nội.*(2006). *Vi sinh y học.* Nhà xuất bản Y học.
2. *Bộ môn Vi sinh trường Đại học Y Hà Nội* (1998). *Thực tập vi sinh vật y học.* Nhà xuất bản Y học.
3. *Bộ môn Ký Sinh Trùng – Trường Đại học Y Hà Nội* (2007) *Ký sinh trùng y học.* Nhà xuất bản Y học .
4. *Bộ môn Sốt rét –Ký sinh trùng- Côn trùng Học viện Quân y* (1994). *Kỹ thuật Ký sinh trùng y học.* Nhà xuất bản Quân Đội nhân dân.
5. *Đào Thị Nguyên, Nguyễn Văn Dip* (2001). “*Vi sinh vật y học - Tài liệu dùng trong các trường Trung học Y tế*”. Nhà xuất bản Y học.
6. *Đoàn Thị Nguyên, Nguyễn Văn Dip* (2004); *Vi sinh vật Y học.* NXB Y học.
7. *Đỗ Dương Thái.* *Ký sinh trùng và bệnh ký sinh trùng ở người (Quyển II và III).* Nhà xuất bản Y học.
8. *Hoàng Thuý Long* (1991); “*Kỹ thuật xét nghiệm Vi sinh vật y học*”; Nhà xuất bản Văn hóa; 39 - 126.
9. *Kỹ thuật cơ bản và đảm bảo chất lượng trong xét nghiệm vi sinh y học.* Nhà xuất bản Y học Hà Nội (2008).
10. *Lê Huy Chính, Đinh Hữu Dung, Bùi Khắc Hậu, Lê Hồng Hinh, Lê Thị Oanh, Lê Văn Phùng, Nguyễn thị Tuyền, Nguyễn Thị Vinh và Nguyễn Vũ Trung* (2007). *Vi sinh y học.* Nhà xuất bản Y học.
11. *Lê Huy Chính và CS.* (2007); “*Vi sinh vật y học - Sách đào tạo Bác sĩ đa khoa*”; Nhà xuất bản Y học.
12. *Lê Thị Xuân* (2008). *Ký sinh trùng thực hành.* Nhà xuất bản giáo dục.
13. *Nguyễn Ngọc Thụy* (2004). *Các phương pháp xét nghiệm, nuôi cấy, phân lập, chẩn đoán nấm.* *Bệnh nấm y học.* Hà nội: NXB Quân đội nhân dân; tr 45.
14. *Phạm Văn Thành*(1978). *Ký sinh vật y học* Nhà xuất bản Y học.
15. *Tài liệu huấn luyện lâm sàng – Điều trị bệnh sốt rét*(1992).*Viện sốt rét - Ký sinh trùng và côn trùng Trung ương.*
16. *Trịnh Trọng Phụng, Lê Bách Quang* (1998) *Fương pháp lấy bệnh*

phẩm để xét nghiệm nấm và phương pháp xét nghiệm trực tiếp. Kỹ thuật ký sinh trùng y học. Hà Nội. Học Viện Quân Y; tr 133-137.

17. Vũ Văn Ngũ, Nguyễn Chán (1982). "Kỹ thuật xét nghiệm Vi sinh y học" Nhà xuất bản Y học, 71 - 72.
18. Vũ Văn Ngũ (1987). "Kỹ thuật xét nghiệm Vi sinh y học" Nhà xuất bản Y học, 46 - 48.
19. Akira Igarashi, MD, PhD. (2000). *Technical manual of Arbovirus study-With special emphasis on Japanese encephalitis and Dengue viruses*. Department of virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Japan.
20. Connie R. Mahon (2007) *Medically Significant Fungi* "Textbook of diagnostic Microbiology" Page 748-750.
21. Connie R. Mahon, Donald C. Lehman, George Manuselis (2007), "Textbook of diagnostic Microbiology", Third edition.
22. Cedric A Mims (1993), "Medical microbiology", Mosby - Year Book Europe Limited.
23. Clinical and laboratory standards institute (2006), "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard - Ninth edition". M2-A9, Vol. 26, No.1.
24. Clinical and laboratory standards institute (2010), "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Twentieth informational supplement". M100-S20, Vol. 20, No.1.
25. Clinical and laboratory standards institute (2011), "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Twenty-first informational supplement". M100-S21, Vol. 31, No.1.
26. Ellen Jo Baron, Sydney M. Finegold (1990), "Bailey & Scott's Diagnostic microbiology", Eighth edition. The C. V. Mosby Company.
27. Knipe D.M, Howley P.M. (2007). *Field Virology*. Fifth Edition, Vol.1; General Virology: 3 605.
28. Lavanchy D. (2005). *Hepatitis B virus-Epidemiology*. *Viral Hepatitis* 3<sup>rd</sup> edition. Blackwell.(181-192)
29. *Microbiology and immunology on-line*. <http://pathmicro.med.sc.edu>

30. *Nikon corporation*, "Nikon Eclipse E200MV Instructions", M541E 10.1.NF.1.
31. *Olympus corporation*, "The Olympus Biological Microscope Model CX31 Instructions", AX6654.
32. *Optica microscopes- Italy*, "OPERATION MANUAL", ver.3.2.0.
33. *Ronald D. Guttman, MD.* (1985). Immunology. McGill University of Medicine.
34. *James G. Cappuccino Natalie Sherman.* (2001). Medical Microbiology a Laboratory manual. New York. USA.
35. *J. Vandepitte, J. Verhaegen, K. Engbaek* (2003), "Basic laboratory procedures in clinical bacteriology", Second edition, World Health Organization – Geneva.
36. *Williams. Medical Microbiology-Mims.* Playfair, Roitt Wakelin.London
37. *WHO(2006)* " Guidelines on Standard Operating Procedures for microbiology"

## TỰ LUẬNG GIÁ

### I. CHỌN CÂU TRẢ LỜI ĐÚNG NHẤT TRONG CÁC CÂU SAU BẰNG CÁCH KHOANH TRÒN VÀO CHỮ CÁI ĐẦU CÂU

Câu 1. Thành phần nào là cấu trúc đặc trưng của tế bào vi khuẩn:

- A. Vỏ
- B. Lông
- C. Vách
- D. Màng bào tương

Câu 2. Trên môi trường lỏng, vi khuẩn phát triển theo các giai đoạn là:

- A.Thích ứng
- B.Tăng theo hàm số mũ
- C.Dừng tối đa và suy tàn
- D.Tất cả các ý trên đều đúng

Câu 3. Sinh lý của vi khuẩn bao gồm:

- A.Dinh dưỡng
- B.Hô hấp và chuyển hoá của vi khuẩn
- C.Phát triển và sinh sản
- D.Tất cả các ý trên đều đúng

Câu 4. Vi khuẩn Gram âm và Gram dương bắt màu khác nhau khi nhuộm Gram là do sự khác nhau trong cấu trúc của:

- A.Vỏ
- B.Vách
- C.Màng bào tương
- D.Pili

Câu 5. *Staphylococcus aureus* là vi khuẩn có hình dạng sau:

- A.Cầu khuẩn Gram (+), đứng thành chùm nho
- B.Cầu khuẩn Gram (-), đứng thành chùm nho
- C.Cầu khuẩn Gram (-), đứng thành chuỗi dài ngắn khác nhau
- D.Cầu khuẩn Gram (+), đứng thành chuỗi dài ngắn khác nhau

**Câu 6.** Tính chất sinh vật hoá học quan trọng để chẩn đoán xác định tụ cầu vàng là:

- A.Catalase
- B.Tan máu beta
- C.Sinh sắc tố
- D.Coagulase

**Câu 7.** Trong các vi khuẩn dưới đây, vi khuẩn nào có sức đề kháng cao hơn so với các vi khuẩn còn lại:

- A.*Staphylococcus aureus*
- B.*Neisseria meningitidis*
- C.*Streptococcus pneumoniae*
- D.*Neisseria gonorrhoeae*

**Câu 8.** Dựa vào tính chất sinh vật hoá học nào sau đây để phân biệt giữa liên cầu tan máu beta nhóm A và phế cầu:

- A.Oxydase
- B.Optochin
- C.Catalase
- D.Coagulase

**Câu 9.** Tính chất sinh vật hoá học nào sau đây được dùng để phân biệt giữa liên cầu nhóm A và tụ cầu vàng:

- A.Catalase
- B.Oxydase
- C.Optochin
- D.Glucose

**Câu 10.** Thủ nghiệm quan trọng để xác định liên cầu nhóm A trong phòng xét nghiệm là:

- A.Oxydase
- B.Coagulase
- C.Catalase
- D.Bactracin

**Câu 11.** Đặc điểm của họ vi khuẩn *Enterobacteriaceae* là:

- A.Hiệu ứng khí tuỳ tiện.
- B.Lên men đường glucose.
- C.Phản ứng Oxydase âm tính
- D.Tất cả các ý trên đều đúng.

Câu 12. Đặc điểm không phải của họ vi khuẩn *Enterobacteriaceae* là:

- A.Di động hoặc không di động.
- B.Vi khuẩn gây bệnh cơ hội.
- C.Có thể sinh nha bào.
- D.Tất cả các ý trên đều không đúng.

Câu 13. Thành viên không thuộc họ vi khuẩn *Enterobacteriaceae* là:

- A.*E. coli*.
- B.*K. pneumonia* và *Proteus mirabilis*
- C.*Enterococcus faecalis*
- D.*Salmonella sp* và *Shigella sp.*

Câu 14. Các kỹ thuật chẩn đoán bệnh nấm:

- A.Xét nghiệm trực tiếp.
- B.Nuôi cấy nấm
- C.Huyết thanh miễn dịch
- D.Cả A, B,C.

Câu 15. Một bệnh nhân có tổn thương da vùng cánh tay nghi ngờ nhiễm nấm da. Trong trường hợp này sử dụng kỹ thuật xét nghiệm nào là chính xác nhất:

- A.Kỹ thuật xét nghiệm trực tiếp bằng NaCl 0,9%.
- B.Kỹ thuật xét nghiệm trực tiếp bằng mực tàu.
- C.Kỹ thuật xét nghiệm trực tiếp bằng KOH 20%.

Câu 16. Khi nghi ngờ tổn thương da do nấm chỗ lấy bệnh phẩm làm xét nghiệm chính xác nhất là:

- A.Trung tâm chỗ da bị tổn thương.
- B.Lấy bất kỳ chỗ da có tổn thương.
- C.Lấy vẩy da ở rìa tổn thương chỗ có tổn thương mới.

**Câu 17.** Một bệnh nhân bị viêm màng não nghi ngờ nhiễm nấm *Cryptococcus neoformans* bác sĩ chỉ định chọc dịch não tuỷ để làm xét nghiệm trực tiếp. Trong trường hợp này sử dụng kỹ thuật nào là chính xác nhất:

- A.Lấy trực tiếp dịch não tuỷ để soi.
- B.Lấy dịch não tuỷ ly tâm lấy cặn để soi.
- C.Lấy dịch não tuỷ ly tâm lấy cặn làm tiêu bản trực tiếp bằng mực tàu.
- D.Lấy dịch não tuỷ ly tâm lấy cặn làm tiêu bản trực tiếp bằng KOH 20%.

**Câu 18.** Môi trường Candida select ( Bio Rad) dùng để phân lập và phân biệt được các loài nấm sau, trừ:

- A.*C. albicans*, *C. tropicalis*.
- B.*C. glabrata*, *C. crusei*.
- C.*C. tropicalis*, *C. glabrata* và *C. krusei*.
- D.*C. famata*, *C. parapsilosis*.

**Câu 19.** Xét nghiệm phân bằng phương pháp Willis có thể tìm thấy loại KST:

- A.Trứng giun đũa
- B.Bào nang amip
- C.Trứng sán lá gan
- D.Bào nang Giardia

**Câu 20.** Kỹ thuật (sắc ký miễn dịch) phát hiện:

- A.Kháng nguyên
- B.Kháng thể
- C.Cả kháng nguyên và kháng thể

**Câu 21.** Có thể dùng kỹ thuật chẩn đoán huyết thanh học để phát hiện:

- A.HBcAg
- B.Anti-HBc IgM
- C.Anti-HBc

**Câu 22.** Kháng thể Anti-HBc IgM xuất hiện trong:

- A.Viêm gan B giai đoạn cấp
- B.Viêm gan B mạn tính
- C.Đợt cấp của viêm gan B mạn tính

**Câu 23.** Kháng thể Anti-HBc có vai trò:

- A.Bảo vệ cơ thể chống tái nhiễm virus
- B.Cho biết bệnh đang ở giai đoạn hồi phục
- C.Cho biết trong tiền sử đã từng nhiễm virus viêm gan B

Câu 24. Những bằng chứng nào cho biết virus viêm gan B tái hoạt động

- A.HBeAg âm tính & Anti-HBc IgM dương tính
- B.HBeAg (+), Anti-HBc IgM (+) & HBV-ADN tăng
- C.HBeAg dương tính, Anti-HBc IgM âm tính

Câu 25. Khi nào kết luận một bệnh nhân bị viêm gan B mạn tính

- A.HBsAg (+) kéo dài trong 1 tháng
- B.HBsAg (+) kéo dài trong 3 tháng
- C.HBsAg (+) kéo dài trên 6 tháng

Câu 26. Kháng thể nào có tác dụng bảo vệ cơ thể chống tái nhiễm HBV

- A. Anti HBc total
- B. Anti HBs
- C. Anti HBe

Câu 27. Virus viêm não Nhật Bản thuộc về:

- A.Họ Alphaviridae của virus Arbo
- B.Họ Flaviviridae của virus Arbo
- C.Họ Rubiviridae của virus Arbo

Câu 28. Trung gian truyền bệnh chủ yếu của bệnh viêm não Nhật Bản là

- A.Muỗi Aedes aegypti
- B.Muỗi Anopheles vagus
- C.Muỗi Culex tritaeniorhynchus
- D.Muỗi Aedes polynesiensis

Câu 29. Kỹ thuật chẩn đoán lý tưởng nhất đối với viêm não Nhật Bản là

- A.Kỹ thuật ngăn ngưng kết hồng cầu
- B.Kỹ thuật PCR
- C.Kỹ thuật trung hoà
- D.Kỹ thuật MAC-ELISA

Câu 30. Phản ứng RPR phát hiện

- A.Xoắn khuẩn giang mai

- B. Kháng thể kháng xoắn khuẩn giang mai
- C. Kháng thể kháng lipid

Câu 31. Phản ứng TPHA phát hiện

- A. Xoắn khuẩn giang mai
- B. Kháng thể kháng xoắn khuẩn giang mai
- C. Kháng thể kháng lipid

Câu 32. Phản ứng TPHA và phản ứng RPR giống nhau ở điểm nào

- A. Cùng phát hiện kháng nguyên
- B. Cùng phát hiện kháng thể
- C. Phát hiện cả kháng nguyên và kháng thể

Câu 33. Kháng nguyên NS1 nằm ở protein không cấu trúc của virus Dengue

- A. Protein lõi C
- B. Protein vỏ E
- C. Protein màng M
- D. Cả B và C

Câu 34. Đặc trưng của đáp ứng sơ nhiễm virus Dengue

- A. IgM xuất hiện sớm và tăng cao hơn IgG
- B. IgM xuất hiện muộn và tăng cao hơn IgG
- C. IgG xuất hiện sớm và tăng cao hơn IgM
- D. IgG xuất hiện muộn và tăng cao hơn IgM

Câu 35. Đặc trưng của đáp ứng tái nhiễm virus Dengue:

- A. IgG xuất hiện sớm và tăng cao hơn IgM
- B. IgG xuất hiện muộn và tăng cao hơn IgM
- C. IgM xuất hiện sớm và tăng cao hơn IgG
- D. IgM xuất hiện muộn và tăng cao hơn IgG

Câu 36. Ưu điểm của kỹ thuật sắc ký miễn dịch tìm kháng thể IgM và IgG

- A. Phát hiện được kháng thể IgM sớm
- B. Phát hiện được nhiễm Dengue ở giai đoạn sớm
- C. Phân biệt được nhiễm Dengue nguyên phát và Dengue thứ phát
- D. Cả B và C

Câu 37. Bệnh tiêu chảy cấp do virus Rota nhóm A thường xảy ra ở trẻ em

- A. Dưới 2 tuổi
- B. Trên 2 tuổi
- C. Trên 3 tháng
- D. Từ 3 tháng đến 2 tuổi

Câu 38. Thời gian ủ bệnh của bệnh tiêu chảy cấp do Rota virus là.

- A. Từ 1 đến 3 ngày
- B. Từ 3 đến 5 ngày
- C. Từ 3 đến 5 ngày

Câu 39. Mục đích của kỹ thuật phát hiện anti streptolysin O

- A. Định danh liên cầu β tan huyết
- B. Xác định kháng nguyên Streptolysin O trong máu của bệnh nhân
- C. Xác định và bán định lượng kháng thể Anti streptolysin O trong máu của BN.
- D. Cả A và B

Câu 40. Nguyên lý của kỹ thuật ngưng kết hạt latex là

- A. Ngưng kết chủ động
- B. Ngưng kết thụ động
- C. Phản ứng trung hoà
- D. Ngưng kết thụ động gián tiếp

## II. ĐIỀN TỪ HOẶC CỤM TỪ THÍCH HỢP VÀO CÁC CHỖ TRÓNG TRONG CÁC CÂU HỎI SAU:

Câu 41. Ké tên 3 loại hình thể chính của vi khuẩn:

- A. Cầu khuẩn
- B. .....
- C. .....

Câu 42. Trên môi trường đặc mỗi vi khuẩn sẽ phát triển thành.....

Câu 43. Vi khuẩn sinh sản theo kiểu(A) .....mỗi tế bào phân chia thành(B).....mới.

**Câu 44.** Ba dạng hô hấp của tế bào vi khuẩn là: hô hấp hiếu khí, hô hấp kỵ khí và .....

**Câu 45.** Các bước tiến hành nhuộm Gram:

- A. Phủ dung dịch tím gentian
- B. ....
- C. Tẩy màu bằng cồn 95<sup>0</sup>
- D. ....

**Câu 46.** Các bước tiến hành nhuộm Ziehl – Neelsen:

- A. ....
- B. Tẩy màu
- C. ....

**Câu 47.** Khi nhuộm Gram vi khuẩn Gram (+) bắt màu(A) .....

vi khuẩn Gram (-) bắt màu(B) .....

**Câu 48.** Men .....do tụ cầu tiết ra có khả năng làm đông huyết tương.

**Câu 49.** Khuẩn lạc của tụ cầu vàng có dạng(A)....., có màu vàng, gây tan máu (B).....

**Câu 50.** Tụ cầu là cầu khuẩn đứng với nhau (A).....bắt màu Gram(B).....

**Câu 51.** Tụ cầu vàng thường không có vỏ, không có (A)..... và không có(B).....

**Câu 52.** Đặc điểm hình dạng của liên cầu nhóm A là những(A).....bắt màu Gram(B)....., xếp thành chuỗi dài ngắn khác nhau.

**Câu 53.** Liên cầu nhóm A có đặc điểm gây tan máu.....

**Câu 54.** Họ vi khuẩn *Enterobacteriaceae* là các trực khuẩn bắt màu(A) ..... chúng có thể sống ở(B) ..... của người và động vật.

**Câu 55.** Tất cả vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* đều lên men đường(A) ..... chúng có thể di động hoặc không di động, nếu di động thì phải có nhiều (B).....

- Câu 56. Họ vi khuẩn *Enterobacteriaceae* có thể có(A) ..... nhưng không sinh(B).....
- Câu 57. *Acinetobacter baumannii* là cầu trực khuẩn, bắt màu .....
- Câu 58. Phân khuẩn tả là loài vi khuẩn rất hiếu khí, phát triển tốt trong môi trường(A) .....( pH 8,5-9,5 ) và nồng độ (B).....3 %
- Câu 59. Tính chất đặc trưng khuẩn lạc của *P. aeruginosa* là sinh sắc tố (A).....và có(B).....
- Câu 60. *Candida* là loại nấm men kích thước nhỏ hình..... đường kính từ 2-5 $\mu$ m, sinh sản theo kiểu nảy chồi.
- Câu 61. Đặc điểm đặc trưng của *C. neoformans* trên tiêu bản mực tàu có .....
- Câu 62. KSTSR ký sinh chủ yếu ở trong tế bào.....
- Câu 63. Sinh vật phải..... vào một sinh vật khác để tồn tại và phát triển, được gọi là ký sinh trùng.
- Câu 64. Virus cúm typ A có thể gây .....
- Câu 65. Kích thước của virus được tính bằng đơn vị.....
- Câu 66. Thành phần cấu trúc cơ bản của virus gồm
- A.....
  - B. Capsid: là cấu trúc bao quanh AN, bản chất hoá học là protein
- Câu 67. Năm giai đoạn nhân lên của virus trong tế bào là
- A. Giai đoạn virus hấp phụ lên tế bào
  - B .....
  - C .....
  - D. Sự lắp ráp các thành phần của virus
  - E .....
- Câu 68. Hiệu giá kháng thể là ... (A).... lớn nhất mà phản ứng ... (B).....  
Hiệu giá kháng thể phản ánh .....(C)..... trong huyết thanh.
- Câu 69. Động lực KT là .....(A)..... theo thời gian. Động lực KT là thương số giữa hiệu giá KT lần thứ 2 và lần 1. Động lực KT ít nhất ... (B)..... (tức là tăng 2 bậc khi HT được(C) ..... ) mới có giá trị chẩn đoán chắc chắn là bệnh nhân đang mắc bệnh nhiễm trùng.

Câu 70. Dương tính giả là hiện tượng .....(A)..... không có .....(B).....cần tìm, nhưng xét nghiệm lại cho kết quả ... (C)..... khi làm xét nghiệm.

Câu 71. Âm tính giả là .....(A)..... có mặt .....(B)..... cần tìm, nhưng xét nghiệm lại .....(C).....

Câu 72. Các phản ứng tạo thành hạt là các phản ứng mà phức hợp (A)..... hình thành dưới dạng hạt có thể quan sát được bằng (B)..... hoặc nhờ sự trợ giúp của (C).....

Câu 73. Nêu 3 kháng nguyên của virus Dengue

A.....

B.....

C.....

Câu 74. Virus Dengue gồm có .... typ.

Câu 75. Truyền virus Dengue cho người chủ yếu là muỗi .....

Câu 76. Virus cúm lây truyền qua đường .....

### III. ĐÁNH DẤU (x) VÀO CỘT Đ CHO CÂU ĐÚNG VÀO CỘT S CHO CÂU SAI

TT	Nội dung	D	S
77	Có thể đựng bệnh phẩm xét nghiệm vi sinh vào các dụng cụ bất kỳ, không vô khuẩn.		
78	Khi lấy bệnh phẩm xét nghiệm vi khuẩn cần đảm bảo vô khuẩn, tránh sự lây nhiễm vi khuẩn từ ngoài vào sẽ làm sai lệch kết quả.		
79	Trên cơ thể người, vi khuẩn có ở tất cả các cơ quan.		
80	Vách có ở tất cả các vi khuẩn.		
81	Tế bào vi khuẩn nào cũng có vỏ.		
82	Vi khuẩn Gram (+) có lớp peptidoglycan mỏng làm cho vi khuẩn giữ chắc màu tím gentian và không bị tẩy màu bởi cồn		
83	Vi khuẩn Gram âm và Gram dương bắt màu khác nhau khi nhuộm Gram là do sự khác nhau trong cấu trúc vách của vi khuẩn.		

TT	Nội dung	D	S
84	Sử dụng dung dịch cồn tẩy HCL 10% trong kỹ thuật nhuộm Ziehl- Neelsen.		
85	Trên môi trường SS, Mac Conkey khuẩn lạc vi khuẩn Shigella trong suốt, hơi hồng do lên men lactose.		
86	<i>Shigella</i> là những trực khuẩn Gram (-), không di động.		
87	<i>Salmonella</i> là những trực khuẩn Gram (-),di động.		
88	Đặc điểm khuẩn lạc của tụ cầu vàng là khuẩn lạc dạng S, tan máu beta và có sắc tố màu vàng.		
89	Trên môi trường TCPS khuẩn lạc của phẩy khuẩn tả có màu xanh do lên men đường sucrose.		
90	<i>E. coli</i> là vi khuẩn không có khả năng lên men đường lactose.		
91	Tụ cầu vàng có khả năng gây bệnh ngộ độc thức ăn.		
92	Môi trường nuôi cây liên cầu nhóm A cần nhiều chất dinh dưỡng và khí trào có 5- 10% CO <sub>2</sub> .		
93	Liên cầu nhóm A có lông và di động.		
94	Liên cầu nhóm A thường gây viêm đường tiết niệu.		
95	Liên cầu nhóm A thường cư trú ở họng miệng.		
96	Nhuộm soi trực tiếp có giá trị chẩn đoán quyết định bệnh do tụ cầu.		
97	Xét nghiệm máu ngoài cơn sốt không phát hiện được ký sinh trùng sốt rét.		
98	Chẩn đoán xét nghiệm đóng vai trò quyết định trong chẩn đoán xác định bệnh giun đũa.		
99	KSTSR ký sinh ở người gồm 4 loại.		
100	Xét nghiệm phân trực tiếp bằng lugol 1% có thể phát hiện được thể hoạt động của Giardia lamblia.		

## ĐÁP ÁN

### I. CHỌN CÂU TRẢ LỜI ĐÚNG:

- |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. C  | 2. D  | 3. D  | 4. B  | 5. A  |
| 6. D  | 7. A  | 8. B  | 9. A  | 10. D |
| 11. D | 12. C | 13. C | 14. D | 15. C |
| 16. C | 17. C | 18. D | 19. A | 20. C |
| 21. C | 22. A | 23. C | 24. B | 25. C |
| 26. B | 27. B | 28. C | 29. D | 30. C |
| 31. B | 32. B | 33. A | 34. A | 35. A |
| 36. A | 37. D | 38. A | 39. C | 40. D |

### II. ĐIỀN TỪ HOẶC CỤM TỪ THÍCH HỢP:

**Câu 41.**

- B.Trực khuẩn  
C. Xoắn khuẩn

**Câu 42.** Một khuẩn lạc

**Câu 43.**

- A.Phân đôi  
B.2 té bào

**Câu 44.** Hiếu khí khí tự tiện

**Câu 45.**

- B. Nhỏ lugol  
D. Phủ dung dịch đỏ Fucsin

**Câu 46**

- A. Phủ dung dịch đỏ Fucsin  
C. Nhỏ xanh methylen

**Câu 47**

- A. Tím gentian  
B. Đỏ Fucsin

**Câu 48.** Coagulase

Câu 49

A. S

B. beta

Câu 50

A. Thành đầm

B. Dương

Câu 51

A. Lông

B. Nha bào

Câu 52

A. Cầu khuẩn

B. Dương

Câu 53. beta

Câu 54

A. Gram(-)

B. Đường ruột

Câu 55

A. Glucose

B. Lông

Câu 56

A. Lông

B. Nha bào

Câu 57. Gram(-)

Câu 58

A. Kiềm

B. Muối

Câu 59

A. Vàng

B. Mùi thơm

Câu 60. Tròn hoặc bầu dục

Câu 61. Quầng sáng bao quanh tế bào nấm

**Câu 62.** Hồng cầu

**Câu 63.** Sống nhờ

**Câu 64.** Đại dịch

**Câu 65.** nm

**Câu 66**

- A. Lõi: mỗi hạt virus hoàn chỉnh đều có lõi là một trong hai loại acid nucleic: ADN (acid deoxyribonucleic) hoặc ARN (acid ribonucleic).

**Câu 67**

- B. Giai đoạn xâm nhập
- C. Sự tổng hợp các thành phần cấu trúc của virus
- E. Sự giải phóng các hạt virus ra khỏi tế bào

**Câu 68**

- A. Độ pha loãng huyết thanh
- B. Còn dương tính
- C. Nồng độ kháng thể

**Câu 69**

- A. Mức độ thay đổi hiệu giá KT
- B. Phải bằng 4
- C. Pha loãng bậc 2

**Câu 70**

- A. Trong mẫu huyết thanh.
- B. Sự hiện diện của KN hoặc KT.
- C. Dương tính.

**Câu 71**

- A. Mẫu huyết thanh/ huyết tương
- B. KN hoặc KT
- C. Cho kết quả âm tính

**Câu 72.**

- A. KN-KT
- B. Mắt thường
- C. Kính lúp

Câu 73.

- A. Protein E
  - B. Protein màng
  - C. Protein lõi C
- Câu 74. 4
- Câu 75. *Aedes aegypti*
- Câu 76. Hô hấp

**III. PHÂN BIỆT ĐÚNG SAI:**

77. S	78. Đ	79. S	80. S	81. S
82. S	83. Đ	84. S	85. S	86. Đ
87. Đ	88. Đ	89. S	90. S	91. Đ
92. Đ	93. S	94. S	95. Đ	96. S
97. S	98. Đ	99. Đ	100. S	

# XÉT NGHIỆM VI SINH LÂM SÀNG

Sách phục vụ đào tạo liên tục

*Chịu trách nhiệm xuất bản:*

**Hoàng Trọng Quang**

*Biên tập:*

**BS. Vũ Thị Bình**

*Sửa bản in:*

**Ths.BS. Trần Hoàng Hiệp  
CN. Lê Anh Tuấn**

*Thiết kế bìa:*

**Nguyễn Đình Thi**

*Chế bản:*

**Trung tâm Đào tạo và Chỉ đạo tuyến Bạch Mai**

---

**© Bản quyền thuộc Đề án Bệnh viện Vệ tinh**

**Bệnh viện Bạch Mai**

---